VERÄNDERUNG DER ZELLOBERFLÄCHE DES SCHLEIMPILZES DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM WÄHREND DER ENTWICKLUNG

DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

NIYATI SARKAR

aus Gopalganj /Indien

1977

VERÄNDERUNG DER ZELLOBERFLÄCHE DES SCHLEIMPILZES DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM WÄHREND DER ENTWICKLUNG

DISSERTATION

zur

Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

dem Fachbereich Biologie

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

NIYATI SARKAR

aus Gopalganj/Indien

1977

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung:	11. August 1977
D e k a n:	Professor Dr. D. Ammermann
1. Berichterstatter:	Professor Dr. V. Braun
2. Berichterstatter:	Professor Dr. H. Zähner

Gesamtherstellung: **aku**-Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

Meiner Familie

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523707_0054

Diese Arbeit wurde unter Anleitung von
Herrn Professor Dr. V. Braun am Institut
für Biologie II, Lehrstuhl Mikrobiologie II
der Universität Tübingen durchgeführt.

Für die Überlassung des Themas, die
wichtigen Anregungen und die stete Förderung
sowie auch für die finanzielle Unterstützung
danke ich Herrn Professor Dr. V. Braun herzlich.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Hantke für das
Durchlesen der Arbeit danken.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 8

2. Material und Methoden 14

2.1 Medium und Puffer: Ashworth Medium, Sörensen Puffer (Phosphatpuffer) 14

2.2 Biologisches Material (Amöben) 15

2.3 Kultivierung der Mikroorganismen 15

Züchtung der Amöben 15

Vorbereitung der Agarplatten

Vorkultur 15

Hauptkultur 16

Sporenvorrat (Konservierung) 16

2.4 Zellaufschluß und Isolierung der Membranen 16

2.4.1 Membranfraktionierung nach der kombinierten Methode von D.F.H. Wallach 16

2.4.2 Phosphatasebestimmung 17

2.4.3 Phosphatasebestimmung bei den intakten Zellen 18

2.4.4 Proteinbestimmung nach der Methode von Lowry 18

2.5 Trypsineinwirkung 19

2.5.1 Einwirkung auf das Wachstum v. Trypsin 19

2.5.2 Trypsineinwirkung auf die ganzen Zellen 20

2.5.3 Trypsineinwirkung auf ein Homogenat 20

2.6 Polyacrylamid-Gelelektrophorese 20

2.6.1 Vorbereitung der Gele und der Lösungen 20

2.6.2 Isolierung der Plasmamembran für die Gelelektrophorese 22

2.6.3 Verschiedene Behandlungen der Plasmamembranen für die Versuche 22

2.8 Zellaufschluß und Isolation der Membranfraktionen (Nitrogen Cavitation-Methode von D.F.E. Wallach) 24

2.8.1 Bereitung radioaktiv markierter E. coli Proteine 25

2.8.2 Proteaseaktivität in den Membranfraktionen 26

2.8.3 Proteasenachweis bei intakten Zellen (Zelloberflächenaktivität) 26

2.8.4 Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Zeit 27

2.8.5 Die Proteaseausscheidung der Zellen ins Medium 28

2.8.6 Proteasenaktivität an der Oberfläche aggregierter Zellen 28

2.9 Isolierung der unbekannten Substanz: Methode zur biologischen Aktivitätsbestimmung 29

2.9.1 Charakterisierung der Substanz 30

2.9.2 Säulenchromatographie: Reinigung der unbekannten Substanz über Bio-Gel A - 0,5 32

2.9.3 a) Biologische Aktivitätsbestimmung 33

b) Phosphodiesteraseaktivitätsbestimmung 34

3. Ergebnisse 35

3.1.1 Schema der Membranfraktionierung nach der kombinierten Methode von D.F.H. Wallach, Green und Newell 35

3.1.2 Schema der Isolation von Mikrosomen nach der Methode von D.F.H. Wallach 36

3.2 Einwirkung von Trypsin auf die Phosphatase 36

3.2.1 Die Wirkung von Trypsin auf das Wachstum 37

3.2.2 Einwirkung von Trypsin auf die Zelloberfläche 39

3.2.3 Einwirkung von Trypsin auf ganze Zellen: 40

spezifische Aktivität der alkalischen Phosphatase in verschiedenen Fraktionen 41

3.2.4 Einwirkung von Trypsin auf aufgeschlossene Zellen 42

3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese 43

3.3.1 Die Wirkung von Trypsin auf logarithmisch wachsende Zellen 44

3.3.2 Die Änderung der Plasmamembranen während der Entwicklung 45

3.3.3 Die Wirkung von Trypsin auf die Zellen verschiedener Entwicklung 47

3.3.4 Die Wirkung von Trypsin auf die isolierte Plasmamembran 49

3.5 Die Proteaseaktivität 50

3.5.1 Die Proteaseaktivität der Zellfraktionen nach der Methode von D.F.H. Wallach 50

3.5.2 Die Proteaseaktivität der Zellfraktionen nach der kombinierten Methode 52

3.5.3 Die Zeitabhängigkeit der Proteaseaktivität 53

3.5.4 Die Proteaseausscheidung der Zellen ins Medium 54

3.5.5 Proteaseaktivitätsnachweis bei intakten Zellen (Zelloberflächenaktivität) 56
3.6.1 Isolierung der unbekannten Substanz 58
3.6.2 Charakterisierung der Substanz 58
3.6.3 Reinigung der unbekannten Substanz über Bio-Gel A-0,5 63
3.6.4 a) biologische Aktivität der Fraktionen 64
b) Phosphodiesterasebestimmung bei denselben Fraktionen 65

4. Diskussion 67

5. Zusammenfassung 76

6. Literaturverzeichnis 78

1. EINLEITUNG

Struktur und Funktion biologischer Membranen haben in Biochemie, Biophysik und Medizin in den letzten Jahren viel Beachtung gefunden. Viele Eigenschaften der Zellen sind durch die Oberfläche der Zellmembran bestimmt. Innerhalb der Zellen findet sich eine Vielzahl von Membranen, die verschiedene "Kompartimente" der Zelle voneinander abgrenzen. Viele dieser Membranen enthalten auch strukturgebundene Enzyme, wie zum Beispiel die Enzymsysteme der Atmungskette und der mikrosomalen Hydroxylierungssysteme (13). Auch die zelluläre Kommunikation, die beim Verhalten der Krebszellen eine wichtige Rolle spielt, ist ein membrangebundener Prozeß. Das Interesse an den Membranen ist deshalb sehr berechtigt.
Der Schleimpilz , Dictyostelium discoideum aus der Ordnung Acrasiales (1) ist ein geeignetes Forschungsobjekt, an dem man sowohl das Verhalten einzelner Zellen , als auch das von differenzierten Zellen, untersuchen kann.
Dictyostelium discoideum wächst normalerweise auf Bakterien. Der axemische Stamm Ax-2 wächst im definierten Medium. Dieser Stamm wurde von Ashworth gezüchtet und ist für biochemische Untersuchungen sehr wichtig, da Dictyostelium discoideum beim Wachstum auf Bakterien störende Fremd-Proteine enthalten würde.

Bei Dictyostelium discoideum findet man einen zweiphasigen Lebenszyklus, das vegetative Wachstum und die Differenzierung, bei der sich Stiel und Sporen ausbilden.

Abb. 1: Die einzelnen Phasen dieser Entwicklung sind in der Abbildung dargestellt (5).

1. Sporen Die Sporen werden bei der Sporulation an der Spitze des Sorokarps aus den sporogenen Zellen gebildet .
2. Amöben Vegetative Zellen wachsen logarithmisch, sie verdoppeln sich in ca. 8 Std. und sind aggregationsfähig, dagegen besitzen die stationären Zellen nur geringe Aggregationsfähigkeit und vermehren sich nicht .

3. Aggregation: wenn die Amöben Zellen (1 x 10^7/ml) in Phosphatpuffer pH 6 inkubiert werden, bilden sie einen vielzelligen Organismus .

4. vollständig aggregiertes Stadium

5. Pseudoplasmodium

6-8. Differenzierung: Bei der Differenzierung wird Fruchtkörper - Sporokarp - gebildet, dies erfolgt im dunkeln auf einer 2-prozentigen Agarplatte bei 23°C .

9. Fruchtkörper, die Sporen tragen.

Zwischen dem vegetativen Wachstum und der Differenzierung findet eine Aggregation statt. Dadurch bildet sich ein vielzelliger Organismus. Während der Aggregation besitzen die Zellen bemerkenswerte Fähigkeiten: auf ein chemotaktisches Signal hin bilden sich interzelluläre Kontakte, die zur Aggregation führen.
Zuerst zeigte Bonner, daß Acrasin (c-AMP)eine chemotaktisch wirksame Substanz ist, die die Aggregation der Zellen auslösen kann (6).
Weiter führende Untersuchungen über die Rolle von c-AMP bei der Aggregation wurden von der Arbeitsgruppe Gerisch durchgeführt.
Es dauert 8 - 10 Std. bis ausgehungerte Zellen aggregieren (Stamm M 1, V 12), nach 12 Std. strömen sie zum Zentrum (9). Die Aggregation wird dadurch ausgelöst, daß im Zentrum spezifische Musterzellen gebildet werden.
Es stellt sich die Frage, ob das Zentrum über ein so großes Feld dominieren kann. Bei Dictyostelium minutum ist das Problem so gelöst, daß zusätzlich ein sekundäres Zentrum ausgebildet wird. Bei Dictyostelium discoideum ist der Vorgang jedoch etwas komplizierter.

Das Aggregationszentrum sendet c-AMP Signale aus, die von den übrigen Zellen im Aggregationsfeld in Wellenform weitergeleitet wird. Diese rythmische Aktivität des Zentrums ist Teil eines Systems von Zellwechselwirkungen, das dem Zentrum ermöglicht, ein großes Feld zu kontrollieren. Wenn der Durchmesser des Aggregationsfeldes 66 mm beträgt und die Geschwindigkeit 43 µ/min., dann brauchen diese Wellen 70 Min., um vom Aggregationszentrum zur Peripherie zu strömen. Wenn alle 5 Min. eine Welle strömt, befinden sich gleichzeitig 14 Wellen im Aggregationsfeld (9).

Die zur Aggregation kompetenten Zellen unterscheiden sich in ihren biochemischen Eigenschaften wesentlich von logarithmisch wachsenden Zellen. Im aggregationsbereiten Zustand reagieren die Zellen viel schneller auf c-AMP (9). Sie besitzen entweder eine hohe Zahl von Receptormolekülen oder die cyclischen AMP Receptoren sind sehr aktiv. c - AMP wird in der Zelle produziert und von den Zellen ausgeschieden. Es ist wahrscheinlich, daß die Zellmembran einen wesentlichen Anteil beim Ausschleusen hat (10).

Mit der Entwicklung der Aggregationsneigung ("Cellcohesiveness") scheint auch die Bildung eines Agglutinationsfaktors in Dictyostelium zusammen zu hängen. Dieser Faktor ist ein Bindeprotein (23), das an der Oberfläche der Plasmamembran lokalisiert ist. Während der Entwicklung (Aushungern) werden diese Proteine nach 5 Std. an der Membran nachweisbar (8). Es ist wichtig, die enzymatische Funktion des Zellinneren zu studieren. Dazu wurde gezeigt (7), daß Dictyostelium discoideum neben Muraminidase und N-Acetylglucosaminidase auch Peptidasen enthalten, welche Mureinpeptide hydrolisieren. Diese Hydrolyse läuft wahrscheinlich innerhalb der Nahrungsvakuolen ab und zeigt im Bereich von pH 3 optimale Aktivität, was typisch für die lysosomalen Enzyme der Amöben ist (2).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein besonderes Gewicht auf die Verteilung der Enzyme in den Membranfraktionen und auf die Zelloberfläche gelegt, sowie die enzymatische Aktivität zu logarithmisch wachsenden und aggregierten Zellen verglichen.

Die Aggregation ist ein komplexer Vorgang, bei dem einige Veränderungen an der Zelloberfläche stattfinden, wobei c – AMP beteiligt ist. Am Ende der Aggregation wird c – AMP durch Phosphodiesterase gespalten. Bei diesem Vorgang könnte auch eine Phosphatase eine Rolle spielen.Darum wird die Phosphatase gewählt.
Zuerst wird die Lokalisation der alkalischen Phosphatase an verschiedenen Zellfraktionen bzw. an der Zelloberfläche untersucht. In diesem Zusammenhang wurde geprüft, wie Trypsin das Aggregationsverhalten verändert und ob die alkalische Phosphatase in situ von Trypsin abgebaut werden kann. Gleichzeitig wurde untersucht, wie die Trypsin-Behandlung auf andere Proteine der Plasmamembran wirkt und ob diese Proteine für die Aggregation notwendig sind. Dabei wurde die Veränderung der Plasmamembran während der Entwicklung verfolgt.

Dictyostelium discoideum hat mehrere Stadien im Lebenszyklus (Abb. 1). Es konnte gezeigt werden, daß während des Durchlaufens der einzelnen Entwicklungsstufen verschiedene Proteine abgebaut werden, die auf die Entwicklung hemmend wirken (28). Es müssen also abbauende Enzyme - z.B. Proteasen- vorhanden sein. Bei Lymphozyten konnte eine neutrale Protease auf der Zelloberfläche festgestellt werden (12).

Nun konnte bei Dictyostelium discoideum neben einer sauren Protease auch eine neutrale Proteaseaktivität nachgewiesen werden, deren Funktion bisher unbekannt war. Zuerst wurde die Lokalisation der neutralen Protease in den verschiedenen Fraktionen der logarithmisch wachsenden Zellen

untersucht. Außerdem bestimmte man auch die neutrale Protease an der Zelloberfläche der logarithmisch wachsenden Zellen und der aggregierter Zellen. Gleichzeitig wurde die mikrosomale neutrale Proteaseaktivität bei den aggregierten Zellen geprüft.

Vermutlich haben membrangebundene Enzyme eine Bedeutung bei der Aggregation der Amöben. Es ist daher interessant, die Aktivität solcher Enzyme in den einzelnen Phasen der Entwicklung von Dictyostelium discoideum zu erklären.

Da es sich zeigte, daß die neutrale Protease in Phosphatpuffer während der Aggregation ausgeschieden wird, soll in dieser Arbeit die Frage untersucht werden, ob die Zellen außer Protease und Phosphodiesterase auch eine weitere biologisch aktive Substanz ausscheiden, die die Aggregation stimuliert.

2. MATERIAL UND METHODEN

Chemikalien

Die meisten verwendeten Chemikalien hatten p.a. Qualität und stammen von E. Merck (Darmstadt), soweit nicht anders erwähnt.

Aquasol (New England Nuclear)
Triäthanolamin-Hydrochlorid (Boehringer)
Alkalische Phosphatase (Boehringer)
Adenosin Desaminase (Boehringer)
c-AMP. (Boehringer)
Phosphodiesterase (Boehringer)
Acrylamid und Bisacrylamid (Serva)
Coomassie Brilliant Blau (Serva)
Natriumdodecylsulfat (Serva)

2.1 Medium und Puffer

Ashworth Medium:

Bakteriological Pepton (Oxoid)	14,3 g
Hefeextrakt (Difco)	7,15 g
D-Maltose (Merck)	18,0 g
$Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$	0,64 g
KH_2PO_4	0,48 g
Aqua dest.	1 Ltr.
pH 6,7	

Sörensen Puffer: (Phosphat-Puffer 17 mM, pH 6)

KH_2PO_4	99,86 g
$Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$	17,8 g

wurde erst mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt und danach 1 : 50 mit Aqua dest. verdünnt und pH 6 eingestellt.

2.2 Biologisches Material (Amöben)

Amöben Dictyostelium discoideum (AX - 2)
Die Untersuchungen wurden an vegetativen Zellen von Dictyostelium discoideum, Stamm AX - 2, durchgeführt.

2.3 Kultivierung der Mikroorganismen

Züchtung der Amöben:

Um die frischen Sporen zu erhalten, wurden die Amöben Dictyostelium discoideum in Ashworth Medium (ca.5 x 10^6/ml) gezüchtet. Nach der Zentrifugation bei 500 g (5 Min.,4°C) wurden die Zellen zweimal mit 17 mM Natriumphosphatpuffer (pH 6)gewaschen. Das Sediment wurde in 1 ml 17 mM Natriumphosphatpuffer aufgenommen und die Suspension auf 6-8 Petrischalen verteilt und ausgestrichen. Die Petrischalen wurden im Dunkeln bei 23°C inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Sporenköpfe sichtbar. Nach 2 - 3 Tagen Inkubation wurden die Platten im Kühlraum bis zu 3 Wochen aufbewahrt.

Vorbereitung der Agar-Platten:

Es wurde 2-prozentiger Agar mit 17 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6, sterilisiert und 20 ml Agar wurde pro Petrischale verteilt. Die Agarplatten bleiben drei Tage bei Zimmertemperatur zum Trocknen stehen. Die Platten wurden anschließend im Kühlraum bei 4°C aufbewahrt.

Vorkultur:

75 ml Ashworth Medium wurde in einem 250 ml-Kolben sterilisiert. Dieses Medium wurde mit den Sporen (von einer Platte) angeimpft und die Kultur bei 23°C zwei Tage inkubiert. Die Zahl der Zellen darf 1 x 10^7/ml nicht übersteigen. Die Zelldichte wurde mit Hilfe der Neubauer Zählkammer bestimmt.

Hauptkultur:

300 ml Ashworth Medium wurden in einem 1 L -Kolben sterilisiert. Dieses Medium wurde mit so viel Amöben angeimpft, daß zum Erntezeitpunkt die Zelldichte der Amöben 4-6 x 10^6 pro ml betrug, (bei einer Generationszeit von 8 Std.). Die Zellen wurden 2 Tage bei 23° unter Schütteln (150 rpm) inkubiert.

Sporen-Vorrat:

Die Sporen von 6 Petrischalen wurden in einem 2 ml - Röhrchen sterilisierte Magermilch suspendiert (1 g Trockenmilch (Nestle) in 10 ml Aqua dest.). Portionen zu 0,2 ml wurden lyophilisiert und unter Vakuum in eine Ampulle eingeschmolzen. Die Aufbewahrung erfolgte im Gefrierfach.

2.4 Zellaufschluß und Isolierung der Membranen

2.4.1 Membranfraktionierung nach den kombinierten Methoden von D.F.H. Wallach und Green & Newell (11, 21, 31)

Diese Methode ist für die Phosphatasebestimmung geeignet. Die Zellen wurden zweimal mit 17 mM Natriumphosphatpuffer und einmal mit Hepespuffer (0,01 M pH 6) gewaschen. Danach wurden die gewaschenen Zellen in 10-prozentige Saccharose mit 10 mM N-Tris-Methylglycine-NaOH-Puffer, pH 7,5 suspendiert und mit flüssigem Stickstoff in einem Dewargefäß aufgeschlossen. Nachdem man das Homogenat bei Zimmertemperatur stehen ließ, wurden die Plasmamembranen (bei 700 g, 20 Min.) isoliert. Der Überstand wurde bei 20.000 g 20 Min. zentrifugiert. Die zweite Fraktion enthält die Lysosomen. Nach der Abtrennung dieser Partikel wurde der Überstand bei 100.000 g, 45 Min. zentrifugiert. Im Sediment befanden sich die Mikrosomen. Die Mikrosomen wurden das erstemal mit Hepes Puffer (0,01 M, pH 7,5) und das zweitemal mit (0,001 M, pH 7,5) gewaschen.

2.4.2 Phosphatasebestimmung

Die Bestimmung der Phosphatase erfolgte mit p-Nitrophenyl-Phosphat als Substrat nach der Methode von Green & Newell (11). Durch alkalische Phosphatase wird p-Nitrophenyl-Phosphat gespalten und man erhält p-Nitrophenolat und anorganisches Phosphat.
Die Zellen sind zweimal mit Natriumphosphatpuffer (17 mM, pH 6) und einmal mit Hepes-Puffer (0,01 M, pH 6) gewaschen worden. Danach wurden die gewaschenen Zellen in 10-prozentiger Saccharose mit 10 mM N-Tris-Methylglycine-NaOH-Puffer, pH 7,5, suspendiert, mit flüssigem Stickstoff 5 Min. aufgeschlossen und die Membranfraktionen isoliert.

In dem Reaktionsansatz befinden sich:

2-Hydroxyäthaylammoniumchlorid (40 mM, pH 9,5)	1,0	ml
$MgSO_4$ (5 mM)	0,2	ml
Kaliumfluorid (2mM)	0,2	ml
Triton X-100 (0,1 %)	0,1	ml
Enzym	0,1	ml
- 5 Min. Inkubation -		
p-Nitrophenylphosphat (Endkonzentration 10 mM)	0,16	ml

Nach einer Inkubation von 5 Min. wurde die Reaktion mit dem Substrat p-Nitrophenylphosphat gestartet. Der Reaktionsansatz wurde 1 Std. bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mit NaOH gestoppt. Die Extinktion der Probe wurde in Küvetten mit 1 cm Schichtdicke bei 405 nm gegen den Leerwert im Eppendorf Photometer gemessen. Die spezifische Aktivität ließ sich mit Hilfe des molaren Extinktionskoeffizienten des p-Nitrophenolats bei 420 nm berechnen ($= 14 \times 10^6$ $cm^2/Mol.$)

$$\text{spezifische Aktivität} = \frac{\Delta E \times \text{Volumen}}{14 \times 1 \times \text{mgProt.xMin.}} \; \mu\text{Mol/mgProt/Min.}$$

2.4.3 Die Phosphatasebestimmung bei den intakten Zellen

Die Bestimmung der Phosphatase bei den intakten Zellen wurde in gleicher Weise durchgeführt wie unter 2.4.2. Die intakten Zellen wurden dabei zweimal mit 17 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6, und einmal mit Hepespuffer (0,01 M, pH 6) gewaschen. Die Zellen wurden in Tricinpuffer (10 mM) pH 7,5 suspendiert, um die Phosphatase zu bestimmen.
Der Phosphatasetest wurde ohne Triton (X-100) bei 30 °C durchgeführt. Bevor man die Extintikon gemessen hatte, wurde die Probe kurz zentrifugiert, damit die Zellen am Boden bleiben. Der Überstand wird bei 405 mn gegen den Leerwert im Eppendorf-Photometer gemessen. Die spezifische Aktivität wurde gleichermaßen bestimmt wie unter 2.4.2.

2.4.4 Proteinbestimmung

Vorratslösungen

Lösung A: 2 g K-Na-Tartrat (Salz der Weinsäure)
100 g Na_2CO_3 in 500 ml 1 N NaOH gelöst
auf 1 l mit Aqua dest. auffüllen

Lösung B: 2 g K-Na-Tartrat
1 g $CuSO_4$ x 5 H_2O
10 ml 1 N NaOH + 90 ml Aqua dest.

Lösung C: immer frisch ansetzen:
1 Vol. Teil Folin Ciocalteus
15 Vol. Teile Aqua dest.

Diese Lösungen A und B wurden in Polyäthylenflaschen aufbewahrt und blieben somit klar und brauchbar für mindestens 6 Monate.

Proteinbestimmung nach der Methode von Laury (15)

Eine quantitative Proteinbestimmung war notwendig, um erstens den Proteingehalt in den Membranfraktionen festzustellen und zweitens, um die spezifische Aktivität der Enzyme zu berechnen.
Das Rinderserumalbumin dient bei diesem Versuch als Eichprotein. Der Leerwert (0 ml + 1 ml Aqua dest.) entspricht dem Nullwert des Eppendorf-Photometers. 5 µg bzw. 10 µg Protein wurden in drei große Reagenzgläser pipettiert und mit Aqua dest. auf 1 ml aufgefüllt. 0,9 ml von der Lösung A wurden dazupipettiert und 10 Min. bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurden die Reagenzgläser zur Abkühlung in ein 25°C Wasserbad gestellt. 0,1 ml Lösung von B wurde jetzt dazupipettiert und 10 Min. bei Zimmertemperatur stehengelassen. Nach einer Inkubation wurden 3 ml Lösung C dazupipettiert und gleich auf den eingeschalteten Mixer gestellt (dieser Vorgang muß innerhalb einer Sekunde ablaufen). Die Gläser wurden wieder 10 Min. ins 50°C Wasserbad zur Inkubation gegeben und anschließend ebenfalls im kalten Wasserbad abgekühlt. Danach wurde den Proben am Eppendorf-Photometer die optische Dichte bei 578 nm in einer 1 cm Küvette abgelesen. Bei der Eichkurve(mg/ml)wurde jeweils 5, 10, 100, 200, und 300 µl Serumalbumin in das Reagenzglas pipettiert.

2.5 Trypsineinwirkung

2.5.1 Wachstumseinwirkung mit Trypsin

Die Amöben (AX-2) Dictyostelium discoideum wurden auf Pepton-Medium zu einer Zelldichte von ca. 5×10^6/ml gezüchtet und sind danach zweimal mit 17 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6 gewaschen worden. Nach dem Waschen wurden die Zellen in 17 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,5, aufgenommen, 0,1-prozentiges Trypsin dazugegeben und bei 23°C 1 Std. bzw. 9 Std. inkubiert.

Danach wurde 0,2-prozentiger Trypsininhibitor dazugegeben und 30 Minuten inkubiert. Nach dieser Behandlung wurden die Zellen 15-fach mit Vollmedium verdünnt. Nun wurde eine Wachstumskurve aufgenommen.

2.5.2 Trypsineinwirkung auf die ganzen Zellen

Die Amöben (AX 2) sind zweimal mit 17 mM Natriumphosphatpuffer, pH 6, bei 500 g und 4°C gewaschen worden und im selben Puffer (pH 7,5) 1 x 10^7 Zellen/ml aufgenommen worden. 0,1-prozentiges Trypsin wurde dazugegeben und bei 23°C 1 Std. (unter Schütteln) inkubiert. Nach der Inkubation wurde die trysinbehandelte Probe bei 500 g zentrifugiert und zweimal mit Hepespuffer, 0,01 M, pH 6, gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 10-prozentiger Saccharose mit 10 mM Tricinepuffer aufgenommen und mit flüssigem Stickstoff 5 Min. aufgeschlossen. Die Plasmamembranen wurden nach der kombinierten Methode (2.4.1) isoliert.

2.5.3 Trypsineinwirkung auf das aufgeschlossene Homogenat

Nach dem Waschen der Zellen (AX-2) wurden sie in Tricinepuffer mit 10-prozentiger Saccharose aufgenommen und aufgeschlossen wie unter 2.5.2 beschrieben. Als das Homogenat 4°C erreicht hatte, wurde 0,1-prozentiges Trypsin dazugegeben und bei Raumtemperatur 1 Std. inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Homogenat bei 700 g 20 Min. zentrifugiert und zweimal mit Tricinepuffer gewaschen. Anschließend wurde es im selben Puffer aufgenommen (pH 7,5), um die Phosphatase zu bestimmen.

2.6. Polyacrylamid Gelelektrophorese (nach Müller)

2.6.1 Die Vorbereitung der Gele und die Lösungen

6-prozentiges Polyacrylamid Gel:
6-prozentiges Acrylamid 0,12 % N,
N'-Methylenbisacrylamid

7,5 ml Gelpuffer
6 M Harnstoff

Die Lösungen sollten auf 30 ml Bidestwasser aufgefüllt werden und entgast werden. Danach wurde

1,5 % Ammoniumperoxydisulfat und
0,15 % N, N, N'-N'-Tetramethyläthylendiamin (TEMED)

dazugegeben und in ein Gelrohr gegossen. Die Gele in den Rohren wurden mit Elektrophoresepuffer überschichtet und 2 Std. stehengelassen. Der Gelpuffer besteht aus:

0,2 M Na-Borat
0,04 M EDTA
0,4 % Natriumdodecylsulfat (SDS) pH 8

Elektrophoresepuffer:

0,01 M Natriumboratpuffer pH 8
0,005 M EDTA-Lösung pH 8
0,1 % SDS

Der Elektrophoresepuffer muß einen pH von 8 haben.

Substanzpuffer:

0,01 M Natriumboratpuffer
0,01 M EDTA-Lösung pH 8
1 % SDS
1 % ß-Mercaptoäthanol
6 M Harnstoff

10 ul von dem Probesubstanzpuffer und 90 ul Protein werden mit 10 µl Bromphenolblau (0,05 %) 5 Min. auf 100°C erhitzt. Anschließend wurden 20-30 µl (75-100 ug) auf die Gele aufgetragen.

Die Stromstärke wurde auf 3m A/Gel eingestellt.
Als Standardproteine dienten Rinderserumalbumin und Ovalbumin.
Die Färbelösung besteht aus:

0,25 % Coomassie-Brilliant-Blau (Serva)
90 ml 50 % Methanol
10 ml Essigsäure

Nach der Elektrophorese wurden die Gele ca. 2 Std. in die Färbelösung gelegt und anschließend in Entfärberlösung gebracht, die ihrerseits aus 5 % Methanol, 7,5 % Essigsäure in Aqua dest. bestand.

2.6.2 Isolierung der Plasmamembranen für die Gelelektrophorese

Nachdem die Zellen (4 - 7 x 10^6/ml) gewachsen waren, wurden sie bei 500 g, 5 Min., bei 4°C zweimal mit 17 mM Na-Phosphatpuffer (pH 6) und danach einmal mit Hepespuffer (0,01 M pH 6) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 10 %ige Saccharose, 10 mM/N-Tris-Methylglycine-NaOH-Puffer (pH 7,5) suspendiert. Die Suspension wurde in einem Kolben mit flüssigem N_2 5 Min. aufgeschlossen und bei Zimmertemperatur stehen gelassen, bis die Probe 4° C erreichte. Das Homogenat wurde bei 700 g 20 Min. zentrifugiert; das erhaltene Sediment enthält die Plasmamembranen. Dieser Niederschlag wurde mit Tris-Puffer (2 mM, pH 7,5) gewaschen.
Danach wurde die Proteinbestimmung der Plasmamembranen nach Laury (2.4.4) durchgeführt. Die Elektrophorese der Plasmamembranen wurde nach der Methode (2.6.1) durchgeführt.

2.6.3 Verschiedene Behandlungen der Plasmamembranen für die Versuche

a) Nachdem die Zellen zweimal mit 17 mM Na-Phosphatpuffer gewaschen wurden, wurden sie (1 x 10^7/ml) in denselben Puffer (pH 7,5) aufgenommen und anschließend wurde

O,1-prozentiges Trypsin dazugegeben und bei 23°C 1 Std. inkubiert.
Die Kontrollprobe erhielt kein Trypsin. Nach 1 Std. Inkubation wurde eine trypsinbehandelte Probe mit O,2-prozentigem Trypsininhibitor noch eine weitere Stunde bei 23°C inkubiert. Ferner wurden auch logarithmisch wachsende Zellen ohne Inkubation weiter mit diesen Proben bearbeitet. (2.4.1)

b) Die gewaschenen Zellen wurden in 17 mM Na-Phosphatpuffer, pH 6, aufgenommen und verschiedene Zeiten (2, 9, und 18 Std.) bei 23°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen, wie unter 2.4.1 beschrieben, weiterbearbeitet.

c) Die Zellen wurden wie unter b) inkubiert, daran anschließend bei 500 g, 5 Min. zentrifugiert und in demselben Volumen Phosphatpuffer, 17 mM, pH 7,5, aufgenommen. Danach wurde O,1-prozentiges Trypsin dazugegeben und 1 Std. bei 23°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen bei 500 g zentrifugiert und weiter bearbeitet.

d) Die logarithmisch wachsenden Zellen wurden ebenfalls gewaschen und bearbeitet, wie unter 2.4.1 beschrieben. Nach der Isolierung der Plasmamembranen wurden dieselben in den Phosphatpuffer, pH 7,5, aufgenommen, O,1-prozentiges Trypsin wurde dazugegeben und bei Zimmertemperatur 1 Std. inkubiert. Anschließend wurden die Plasmamembranen 20 Min. bei 700 g zentrifugiert. Das Sediment wurde mit Tris. (2mM, pH 7,5) gewaschen. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry (siehe 2.4.4).

2.8 Zellaufschluß und Isolierung der Membranfraktionen nach der Nitrogen Cavitation Methode von D.F.E. Wallach (31,21)

Die Amöben-Zellen wurden zweimal mit Na-Phosphatpuffer, (17 mM pH 6) und einmal mit Hepespuffer (0,01 M, pH 6) gewaschen. Danach wurden die Zellen in einer Konzentration von 1 x 10^8/ml in 0,02 M Hepespuffer, pH 7,5, 5 mM $MgCl_2$ suspendiert. Anschließend wurde das gleiche Volumen 0,5 M Saccharose unter konstantem Rühren hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde 20 Min. bei 4°C in einer Artisan-Bombe mit 50 Atm. N_2 unter leichtem Rühren equilibriert. Der Aufschluß der Zellen tritt ein beim anschließenden tropfenweisen Austritt der Zellen aus der Bombe, (Artisan Metal Products, Waltkam, Mass., U.S.A.) Das Zellhomogenat wurde bei 500 g, 20 Min. zentrifugiert; das Sediment enthält die Zellkerne.
Zu dem Überstand wurde Äthylendiamintetraacetat (EDTA) in einer Endkonzentration von 2 mM gegeben, um Schwermetallionen zu binden, die proteolytische Enzyme aktivieren. Der Überstand wurde dann 15 Min. bei 20.000 g zentrifugiert. Dadurch wurden die Lysosomen aus dem Überstand gewonnen. Das erhaltene Sediment, das von dem Lysosomenüberstand durch Zentrifugation (bei 100.000 g, 45 Min., 60 Ti Rotor, Beckmann) gewonnen wird, enthält die Mikrosomen.
Die Mikrosomen für die Untersuchungen wurden das erstemal mit Hepespuffer (0,01 M, pH 7,5) und das zweitemal mit 0,001 M, pH 7,5 gewaschen, um die Verunreinigungen, die sich in Mikrosomenfraktionen befinden, auszuwaschen. Die Mikrosomen wurden in Hepespuffer, der 0,25 M Saccharose enthielt, suspendiert und bei -70°C aufbewahrt.

2.8.1 Bereitung radioaktiv markierter E. coli-Proteine

E. Coli, W 7 (dap^-, lys^-) (von U. Schwarz, Tübingen) wurde auf M 9 Minimalmedium (I) mit 0,4-prozenziger Glucose, 20 mg/l Diaminopimelinsäure und 10 mg/l Lysin bei 37°C gezüchtet.

M 9 Salz-Medium:

Na_2HPO_4	6 %
KH_2PO_4	3 %
NaCl	0,5 %
NH_4Cl	1 %

mit Aqua dest. auffüllen und sterilisieren.

Anschließend wurden die Zellen von der Vorkultur in 1 l Kolben mit 300 ml sterilem (M 9) Medium als Hauptkultur angeimpft. Das Medium enthält:

M 9 Medium
5 mg L-Lysin
10 mg Diaminopimelinsäure,
0,2-prozentige Glucose
50 µCurie ^{14}C-Lysin (The Radiochemical Centre, Amersham).

Über Nacht wurden die Zellen bei 37°C inkubiert. Die optische Dichte sollte 1,2 - 2 bei 578 nm betragen. Nachdem die Zellen gewachsen waren, wurden sie in 20 Min. zentrifugiert (bei 70.000/Min) (Sorvall) und mit Aqua dest. gewaschen. Danach wurden die Zellen in 10 ml Aqua dest. und 10-prozentiger TCA suspendiert. Die Suspension wurde zentrifugiert und viermal mit 0,1-prozentiger Essigsäure gewaschen. Das Sediment wurde lyophilisiert.
Die Aktivität der Probe betrug 550.000 cpm/mg

2.8.2 Proteaseaktivität in den Membranfraktionen

Die Amöben-Zellen wurden geerntet, gewaschen und die Membranfraktionen nach der Methode (2.8) isoliert. Das gewonnene Sediment enthält die Mikrosomen. Diese wurden zweimal mit Hepespuffer (0,01 M, pH 7,5) und (0,001 M, pH 7,5) gewaschen.
Im Testansatz befindet sich:

Natriumcitratpuffer (0,1 M, pH 7)	0,1 ml
^{14}C-Lysin markiertes E. coli Protein	0,1 ml
isolierte Membranen	0,2 ml
Triton 100-X (2 %)	0,1 ml

Nachdem die Proben 2 Std. bei 37°C inkubiert wurden, fügte man 0,5 mg Serumalbumin (0,1 ml) und 0,1 ml 10-prozentige TCA zu, um die Proteine auszufällen. Danach wurden die Proben zentrifugiert (Tischzentrifuge). Der Überstand von 0,4 ml wurde mit 5 ml Aquasol (New England Nuclear) im Szintillationszähler gezählt, um die Radioaktivität zu ermitteln.
Die Kontrollprobe wurde auf dieselbe Weise inkubiert, nur daß anstelle von isolierten Membranen, 0,2 ml Puffer dazugegeben wurde.

Ultraschallbehandlung: Die Proben wurden im Eisbad 3 Min. beschallt (30 Sek. beschallen und 30 Sek. abkühlen).

2.8.3 Proteasenachweis bei intakten Zellen

Die logarithmisch wachsenden Zellen wurden zweimal mit Phosphatpuffer (17 mM, pH 6) und einmal mit Hepespuffer (0,01 M, pH 6) gewaschen, danach wurden die Zellen in Hepespuffer (0,01 pH 7,5) resuspendiert, um die Proteaseaktivität an der Zelloberfläche zu prüfen. Die Zellzahl wurde mit der Neubauer Zählkammer bestimmt.

Im Testansatz befindet sich:

Natriumcitrat-Puffer (0,1 M.)	0,1 ml
^{14}C-Lysin markiertes E.coli Protein	0,1 ml
intakte Zellen (kein Triton)	0,2 ml

Die Proben wurden verschieden lang (3, 10 und 30 Min.) inkubiert (bei 37°C). Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (Tischzentrifuge). Der erhaltene Überstand wurde mit 0,5 mg Serumalbumin (0,1 ml) und 0,1 ml 10-prozentiger TCA ausgefällt und nochmals zentrifugiert. Im Überstand (0,4 ml) wurde die Radioaktivität ermittelt. Die Kontrollprobe wurde auf dieselbe Weise bearbeitet, aber anstelle der Zellen wurden 0,2 ml Puffer dazugegeben.

2.8.4 Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Zeit

Um die Zeitabhängigkeit der Enzymaktivität festzustellen, wurde die Proteaseaktivität stündlich gemessen. Dazu wurden die logarithmisch wachsenden Zellen zuerst zweimal mit Na-Phosphatpuffer, 17 mM, pH 6 und einmal mit Hepespuffer (0,01 M, pH 6) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen aufgeschlossen und die Membranen nach der kombinierten Methode isoliert. Im Testansatz befinden sich dieselben Reagenzien wie unter (2.8.2) verwendet.
Die Proben wurden bei 23°C jeweils 1,2,3 und 4 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation fügte man 0,5 mg Serumalbumin (0,1 ml) und 0,1 ml 10-prozentiger TCA zu, um die Proteine auszufällen. Danach wurden die Proben zentrifugiert (Tischzentrifuge). Der Überstand von 0,4 ml wurde mit 5 ml Aquasol suspendiert, und die Radioaktivität ermittelt. Die Kontrollproben wurden auf dieselbe Weise behandelt, nur daß anstelle von isolierten Membranen 0,2 ml Puffer dazugegeben wurde.

2.8.5 Die Proteaseausscheidung der Zellen ins Medium

Drei 500 ml-Kolben, von denen jeder jeweils 150 ml steriles Ashworth Medium enthielt, wurden mit Sporen von Amöben angeimpft und bei 23°C inkubiert. Nach 24, 48 und 72 Stunden wurde jeweils ein Kolben bei 500 g zentrifugiert. Vor der Zentrifugation wurde die Zelldichte/ml mit Hilfe der Neubauer Zählkammer gezählt. Der Überstand wurde für die Bestimmung der Proteaseaktivität benützt. 4,5 Tage nach Impfung der Sporen wurde die Kultur genauso behandelt wie oben beschrieben und getestet.

Im Testansatz befindet sich:

Na-Citrat-Puffer (0,1 M.)	0,1 ml
^{14}C Lysin markiertes E.coli Protein	0,1 ml
Überstand Medium	0,2 ml

Die Kontrollproben enthielten nur Ashworth Medium ohne Zellen. Die Proben wurden bei 37°C 2 Std. inkubiert und weiter bearbeitet, wie bei der Proteasebestimmung nach der Methode (2.8.2).
Gleichzeitig wurden die logarithmisch wachsenden Zellen geerntet, zweimal mit 17 mM, pH 6 Na-Phosphatpuffer gewaschen. Danach wurden die Zellen 1 x 10^7/ml in demselben Phosphatpuffer aufgenommen und 18 Std. bei 23°C inkubiert, und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde aufbewahrt, um damit die Protease-Tests durchzuführen. Die Kontrollprobe enthielt nur Phosphatpuffer.

2.8.6 Proteasenaktivität an der Oberfläche aggregierter Zellen

Die Amöben Zellen (AX-2) sind mit 17 mM Na-Phosphatpuffer, pH 6 gewaschen worden.

1 x 10^7/ml Zellen wurden in demselben Puffer aufgenommen und 18 Std. bei 23°C (unter Schütteln) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen wieder 5 Min. bei 500 g zentrifugiert, mit Hepespuffer (0,01 M, pH 6) gewaschen und gleich in Hepespuffer, pH 7,5 suspendiert, um die Protease zu bestimmen. Die Zelldichte wurde mit Hilfe der Neubauer Zählkammer gezählt. Die Kontrollproben sind in derselben Weise bearbeitet worden, nur anstelle der Zellen wurde 0,2 ml Puffer benutzt. Die Proben wurden 3, 10 und 30 Min. inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zentrifugiert und der Überstand weiter bearbeitet wie in (2.8.2). Die Radioaktivität des Sedimentes wurde ebenfalls mit 5 ml Aquasol gezählt.

2.9 Isolierung der unbekannten Substanz

Die Amöben Zellen (5 x 10^6/ml) wurden bei 500 g zentrifugiert und zweimal mit Na-Phosphatpuffer 17 mM, pH 6, gewaschen und anschließend in demselben Puffer (1 x 10^7/ml) aufgenommen und 18 Std. bei 23°C inkubiert. Die Zentrifugation erfolgte bei 500 g und der Überstand wurde in einen Dialyseschlauch gegeben und mit Aquacid konzentriert. 1 ml der isolierten Substanz wurde zu den 50 ml Zellen, die sich bereits in Na-Phosphatpuffer, pH 6, (1 x 10^7/ml) befanden, dazugegeben und 18 Std. bei 23°C inkubiert.

Methode zur biologischen Aktivitätsbestimmung

Eine 2-prozentige Agarplatte (Phosphatpuffer, pH 6) wurde vorbereitet und mit 0,5 ml gewaschener Zellsuspension ausplattiert. Die Agarplatte wurde bei 23°C im Schrank inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Platten mikroskopisch beobachtet, um den Aggregationsvorgang zu verfolgen.

2.9.1 Charakterisierung der Substanz

a) biologische Aktivitätsbestimmung

Nach der Zentrifugation (500 g, 5 Min. bei $4^{o}C$) der Zellen, (5 x 10^{6}/ml x 300 ml) wurden sie zweimal mit 17 mM Na-Phosphatpuffer, pH 6 gewaschen. Diesen Zellen wurde 1 ml Substanz dazugegeben; 0,5 ml dieser Suspension wurde dann auf 2-prozentige Agarplatten, die mit 17 mM Na-Phosphatpuffer pH 6 vorbereitet wurden, ausplattiert. Die Agarplatten wurden bei $23^{o}C$ im Schrank inkubiert. Die mikroskopische Beobachtung konnte nach 7 - 8 Std. erfolgen. Die Agarplatten sollten mindestens 3 Tage vorher vorbereitet werden und zum Trocknen bei Zimmertemperatur aufbewahrt werden.

b) Abhängigkeit der Aktivität von der Substanzmenge

Die Dialysate wurden in verschiedenen Reagenzgläsern in folgenden Mengen pipettiert:

0,4 ml Substanz ohne Na-Phosphatpuffer pH 6
0,2 ml Substanz ohne Na-Phosphatpuffer pH 6
0,1 ml Substanz ohne Na-Phosphatpuffer pH 6
0,1 ml Substanz plus 0,4 ml Na-Phosphatpuffer
0,1 ml Substanz plus 0,9 ml Na-Phosphatpuffer
0,08 ml Substanz plus 0,92 ml Na-Phosphatpuffer
0,05 ml Substanz plus 0,95 ml Na-Phosphatpuffer

Dazu wurden die gewaschenen logarithmisch wachsenden Zellen gegeben. Die Suspensionen wurden auf 2-prozentigen Agarplatten ausplattiert und bei $23^{o}C$ inkubiert. Nach 7 - 8 Std. konnte die mikroskopische Beobachtung erfolgen.

c) Hitzewirkung auf die Substanz

0,1 ml der isolierten Substanz wurden in 0,4 ml 17 mM Na-Phosphatpuffer pipettiert und 10 Min. in einem Wasserbad von 80°C inkubiert. Nachdem die Substanz abgekühlt war, wurden die Zellen (5×10^7) dazugegeben. Zum Vergleich wurde ein Versuch ohne Erhitzen mit der Substanz durchgeführt. Die Kontrollprobe enthielt nur 0,5 ml Puffer und die 5×10^7 Zellen. Diese Suspensionen wurden auf 2-prozentige Agarplatten ausplattiert und bei 23°C in einem Schrank inkubiert. Anschließend wurden die Platten beobachtet.

d) Trypsinwirkung auf die Substanz

Bei dieser Untersuchung wurde 0,5 mg Trypsin in 0,1 ml und 1 mg Trypsininhibitor in 0,1 ml Aqua dest. gelöst. Es wurden verschiedene Proben vorbereitet:

1. Substanz plus Trypsin plus Zellen
2. Substanz ohne Trypsin plus Zellen
3. Phosphatpuffer plus Zellen

Inkubationsbedingungen:

1. 0,3 ml Na-Phosphatpuffer, pH 7
   0,1 ml Substanz
   0,1 ml Trypsin (0,5 mg)
   5×10^7 Zellen

2. 0,4 ml Na-Phosphatpuffer, pH 7,5
   0,1 ml Substanz
   5×10^7 Zellen

3. 0,5 ml Puffer
   5×10^7 Zellen

e) Prüfung der Aggregation der Zellen aus verschiedenen Stadien

Aggregationskompetente Zellen

Nach zweimaliger Waschung der Amöben mit Na-Phosphatpuffer 17 mM, pH 6, wurden sie in denselben Puffer (1×10^7/ml) aufgenommen und 18 Std. bei 23°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Zellen bei 500 g. 5×10^7 Zellen wurden in 0,5 ml Phosphatpuffer suspendiert und auf der Agarplatte ausplattiert. Nachdem die Platten bei 23°C inkubiert waren, konnten sie mikroskopisch beobachtet werden.

Logarithmisch wachsende Zellen

Nachdem die logarithmisch wachsenden Zellen gewaschen wurden, nimmt man die Zellen (5×10^7) in 0,5 ml Phosphatpuffer, pH 6, auf und behandelt sie wie die aggregationskompetenten Zellen.

Stationäre Zellen

Die Amöben Zellen sollen 2×10^7/ml in Ashworth Medium wachsen. Sie sollen, wie oben beschrieben, gewaschen und 5×10^7 in 0,5 ml Phosphatpuffer aufgenommen werden. Danach plattiert man die Suspension auf einer 2-prozentigen Agarplatte aus und inkubiert diese bei 23°C im Schrank. Nach 7-8 Std. kann die Aggregation mikroskopisch verfolgt werden.

2.9.2 Säulenchromatographie

Reinigung der unbekannten Substanz über Bio-Gel-A-0,5

500 ml Bio-Gel (Bio-Rad) wurden erst mit dem Aqua dest. gewaschen, in 1 l Na-Phosphatpuffer, 17 mM, pH 6, vorgequollen und entgast. Eine Säule von 47 cm Höhe und 3,5 cm Ø wurde mit Bio-Gel gefüllt und über Nacht mit dem Phosphatpuffer äquilibriert.

2 ml der dialysierten Substanz wurden auf die Säule aufgetragen, mit Phosphatpuffer eluiert und zu Portionen von 2,5 ml aufgefangen. Die Flußgeschwindigkeit betrug 10 ml/Std. Der Trennungsvorgang wurde bei 4°C durchgeführt. Mit einem UV-Spektrometer bei 280 nm wurde der Proteingehalt der einzelnen Fraktionen verfolgt.
Mit den einzelnen Fraktionen wurden nachfolgende Tests durchgeführt:

A) Biologische Aktivitätsbestimmung
B) Phosphodiesterase-Aktivitätsbestimmung

Substanzvorbereitung (für die Säule)

600 ml Zellen (5×10^6) wurden in einem 2 l Kolben in Ashworth Medium gezüchtet und geerntet. Die Zellen wurden mit 17 mM Na-Phosphatpuffer zweimal gewaschen und in demselben Puffer aufgenommen (1×10^7/ml). Danach erfolgte eine Inkubation von 18 Std. bei 23°C. Nach derselben wurden die Zellen zentrifugiert und der Überstand in mehreren Portionen mit Aquacid bei 4°C konzentriert . Das erhaltene Konzentrat betrug ca. 2 ml. Dieses Konzentrat wurde auf eine vorbereitete Bio-Gel-Säule aufgetragen und mit dem Na-Phosphatpuffer 17 mM, pH 6, bei 4°C eluiert.

2.9.3 A) Biologische Aktivitätsbestimmung

Nach der Fraktionierung konnte die biologische Aktivität geprüft werden. Wie schon bereits beschrieben, wurden 2-prozentige Agarplatten vorbereitet. Die logarithmisch wachsenden Zellen wurden geerntet, zweimal mit Na-Phosphatpuffer gewaschen und 5×10^7 Zellen mit 0,5 ml Fraktionen auf die vorbereiteten Agarplatten ausplattiert. Die Platten wurden bei 23°C im Schrank inkubiert und konnten nach 7-8 Std. mikroskopisch beobachtet werden.

B) Phosphodiesterase-Aktivitätsbestimmung

Die Phosphodiesteraseaktivität der Säulenfraktionen wurde mit dem Photometer (Zeiss) bei 265 nm gemessen.

Reagenzien:

Triäthanolamin-Hydrochlorid-Puffer 0,1 M, pH 7,5 (Boehringer)

$MgSo_4 \times 7\ H_2O$ 0,4 M

Adenosin Desaminase	2 mg/ml	(Boehringer)
Alkalische Phosphatase	5 mg/ml	(Boehringer)
cyklisches AMP	1 mg/ml	(Boehringer)

		Kontrolle
Triäthanolaminhydrochlorid-Puffer	2,81 ml	2,81 ml
$Mg\ SO_4 \times 7\ H_2O$	0,03 ml	0,03 ml
Adenosin Desaminase	0,01 ml	0,01 ml
Alkalische Phosphatase	0,02 ml	0,02 ml
cyklisches AMP	0,03 ml	
Wasser	-	0,03 ml

erste Messung = E_1

Phosphodiesterase (von der Säulenfraktion)	0,1 ml	0,1 ml

zweite Messung = E_2

Phosphodiesterase wurde nach den Boehringer-Formeln berechnet:

$$C = \frac{3,00}{8,1 \times 1,0 \times 0,03} \times \Delta E$$

µmol Inosine in 1 Min. gebildet

3. ERGEBNISSE

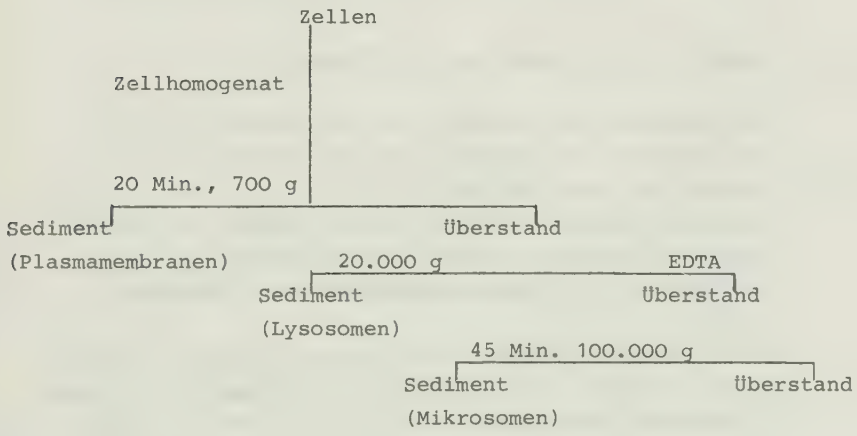
Isolierung der Membranfraktionen von Dictyostelium discoideum und die Bestimmung der enzymatischen Aktivität.

1. Membranfraktionierung nach der Methode von D.F.H. Wallach (2.4)

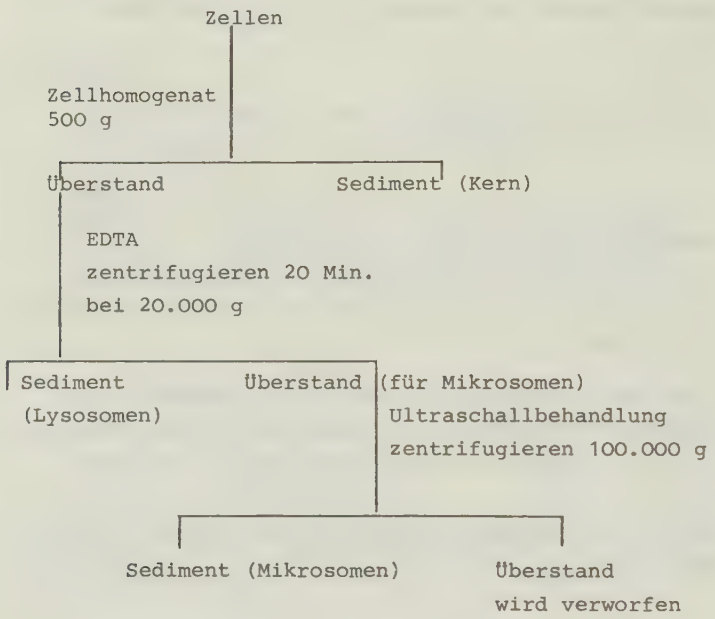
Dieselbe Methode wurde auch zur Gewinnung von Plasmamembranen von Leberzellen angewandt.
Die Methode von D.F.H. Wallach ist eine geeignete Methode zur Isolierung der Membranen von Dictyostelium discoideum.

Diese Methode wurde von Good etwas geändert (21). Anstatt Na-Phosphatpuffer wurde Hepespuffer (4-Hydroxyäthyl-1-Piperazin-2-äthanolsulfonsäure) benutzt.

3.1.1 Schema der Membranfraktionierung nach der kombinierten Methode von D.F.H. Wallach und Green & Newell (11,21)



3.1.2 Schema der Isolierung von Mikrosomen nach der Methode von D.F.H. Wallach



3.2 Einwirkung von Trypsin auf die Phosphatase

Ausgehend von der Annahme, daß spezifische Proteine oder Enzyme auf der Zelloberfläche eine wesentliche Funktion bei der Aggregation von Dictyostelium discoideum haben, sollte untersucht werden, wie durch Proteaseeinwirkung (Trypsin) das Aggregationsverhalten und einzelne Membranenzymaktivitäten verändert werden.
Dafür wurden logarithmisch wachsende Zellen aus neuen Sporen angezogen und 2 Std. mit 0,1-prozentigem Trypsin in Phosphatpuffer, pH 7,5 inkubiert. Es erfolgte eine mikroskopische Beobachtung, die zeigte, daß diese Zellen weniger kompakt agglutiniert waren als die unbehandelten Zellen.

Es ist nicht auszuschließen, daß die trypsinbehandelten Zellen außer in der Aggregationsfähigkeit noch in anderen Eigenschaften verändert sind, z.B. im Vermehrungsverhalten.

3.2.1 Die Wirkung von Trypsin auf das Wachstum

Zellen, die nur 1 Std. mit Trypsin inkubiert, dann mit Trypsininhibitor behandelt und anschließend wieder in frisches Medium gegeben wurden, zeigen keine Verzögerungsphase, sondern sie wachsen sofort weiter. Jedoch die Zellen, die 9 Std. mit Trypsin inkubiert wurden, dann mit Trypsininhibitor behandelt und anschließend in frisches Medium gegeben wurden, zeigen ein deutlich verzögertes Wachstum. Dies ist jedoch nicht eindeutig auf die Trypsinbehandlung zurückzuführen, da die Zellen nach 9 Std. in Phosphatpuffer ausgehungert sind. Die Kontrolle ohne Trypsin zeigt nämlich auch, daß diese Zellen nicht in der Lage sind, sich sofort zu vermehren. Die Zellen müssen zuerst wieder eine Anlaufphase durchmachen, bevor sie Protein synthetisieren und sich vermehren können.

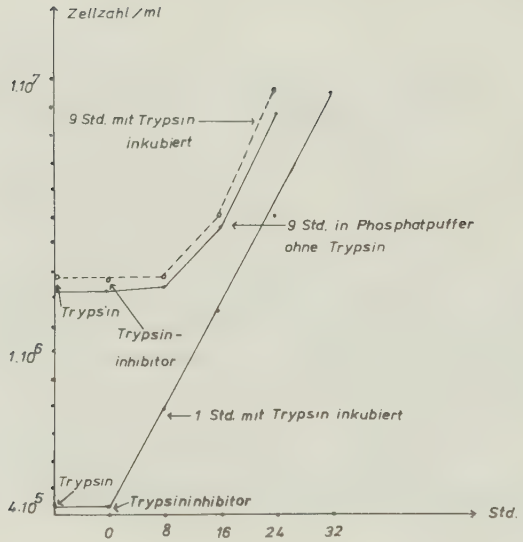


Abb.: 2

Die Vermehrungskurve der Zellen, die 1 Std. bzw. 9 Std. mit Trypsin inkubiert wurden, anschließend wurde mit Trypsininhibitor inkubiert und im Pepton-Medium angeimpft.

3.2.2 Einwirkung von Trypsin auf die Zelloberfläche

Als ein Beispiel für die Trypsineinwirkung auf ein membrangebundenes Enzym wurde die alkalische Phosphatase untersucht. Sie ist bei Dictyostelium discoideum zum Teil auf der Zelloberfläche lokalisiert. Die Untersuchungen mit ganzen Zellen wurden deshalb auch auf den plasmamembrangebundenen Anteil der alkalischen Phosphatase ausgedehnt. Als Kontrolle sollte schließlich der Einfluß von Trypsin auf die Phosphataseaktivität aufgeschlossener Zellen dienen.
Dazu wurde zuerst ein Versuch mit intakten Zellen mit Trypsin- und ohne Trypsinbehandlung durchgeführt. Es wurden die logarithmisch wachsenden Zellen und die aggregierten Zellen (Tabelle 1) gleichzeitig untersucht, um eventuelle Unterschiede bezüglich der Aktivität zu beobachten.
Zu diesem Versuch wurden die gewaschenen Zellen in Tricinepuffer, pH 7,5 aufgenommen, um die Phosphatase zu bestimmen. Vor der Extinktionsmessung (405 nm) wurden die Proben kurz zentrifugiert und der Überstand gemessen.

Tabelle 1: Spezifische Aktivität(µmol/min/mg) der alkalischen Phosphatase der intakten Zellen bei pH 9,5. Der Leerwert ohne Enzym wurde von den Proben abgezogen.

Probe:	spezifische Aktivität
logarithmisch wachsende Zellen	3
logarithmisch wachsende Zellen plus Trypsin	2,4
Zellen, 12 Std. im Phosphatpuffer	4,5

Wie aus der Tabelle zu ersehen ist, wird bei Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase die alkalische Phosphatase durch Trypsin sehr wenig in ihrer Aktivität beeinflußt.
Die aggregierten Zellen zeigen eine fast doppelt so große Zelloberflächenaktivität als die logarithmisch wachsenden Zellen, d.h. die Zelloberflächenaktivität nimmt bei der Aggregation zu.
Es bestand die Frage, ob bei der Phosphatasebestimmung die Zellen intakt bleiben und tatsächlich nur Oberflächenaktivität der alkalischen Phosphatase gemessen wurde. Dazu wurden die intakten Zellen zuerst für die Phosphatasebestimmung 30 Min. inkubiert, in Ashworth Pepton-Medium angeimpft und bei 23°C inkubiert. Die Zellen wachsen logarithmisch und zeigen sich damit lebensfähig. Offenbar hat eventuell in die Zelle diffundiertes Substrat (p-Nitrophenylphosphat) keine Auswirkung auf die Lebensfähigkeit der Zelle.

3.2.3 Einwirkung von Trypsin auf ganze Zellen

Nachdem die Veränderung der Enzymaktivität der Zelloberfläche durch Trypsinbehandlung gezeigt wurde, sollte man prüfen, ob die alkalische Phosphatase in den Plasmamembranen der trypsinbehandelten Zellen noch deutlichere Unterschiede gegenüber den unbehandelten Zellen zeigen.
Voraussetzung für den oben genannten Versuch ist die Kenntnis der Verteilung der alkalischen Phosphatase auf die Zellfraktionen von logarithmisch wachsenden Zellen. Die Membranen wurden nach der kombinierten Methode (3.1.1) isoliert.

Tabelle 2: Spezifische Aktivität (µmol/min/mg) der alkalischen und sauren Phosphatasen in den verschiedenen Fraktionen. Der Leerwert ohne Enzyme wurde abgezogen.

Fraktionen	spezifische Aktivität gemessen bei pH 9,5	spezifische Aktivität gem. bei pH 3,5
I 700 g (Pl.Memb.)	9,8	5,1
II 20.000 g (Lysoso:)	5,5	1,6
III Überstand von Mikrosomen	1,2	0,48
IV Mikrosomen	3,1	1,2

Aus der Tabelle kann man folgende Resultate entnehmen:

Die höchste Aktivität besitzt die Plasmamembran, die zweithöchste Aktivität die Lysosomen und die dritthöchste Aktivität besitzen die Mikrosomen.

Die saure Phosphatase zeigt die gleiche Verteilung, ist aber weniger aktiv als alkalische Phosphatase.

Als nächstes wurden die Plasmamembranen von trypsinbehandelten und trypsinunbehandelten Zellen untersucht.

Dazu wurden die gewaschenen Zellen in Phosphatpuffer, pH 7,5 1 x 10^7/ml aufgenommen, 0,1-prozentiges Trypsin dazugegeben und bei 23°C 1 Std. inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Trypsin durch Zentrifugation und Waschung entfernt. Die Plasmamembranen wurden von diesen Zellen nach der Methode (3.1.1) isoliert.

Tabelle 3: Spezifische Aktivität (µmol/min/mg) der alkalischen Phosphatase bei trypsinbehandelten Zellen. Der Leerwert ohne Enzym wurde abgezogen.

Probe	spez. Aktivität pH 9,5	spez. Aktivität pH 3,5
Kontrolle	8,7	4,2
Zellen plus 0,1-prozentiges Trypsin	3,3	2,2

Die Phosphatasenaktivität der isolierten Plasmamembran nach Einwirkung von Trypsin auf ganze Zellen ist stark reduziert.

3.2.4 Einwirkung von Trypsin auf aufgeschlossene Zellen

Man kann annehmen, daß bei den aufgeschlossenen Zellen die alkalische Phophatase durch Trypsin stärker angegriffen wird als bei den nicht aufgeschlossenen Zellen, da nun Trypsin direkter wirken kann. Dieses Experiment sollte den Effekt von Trypsin auf die verschieden lokalisierte alkalische Phosphatase ergänzen.
Nachdem der Aufschluß der Zellen, das Homogenat, die Temperatur von 4°C erreicht hatte, wurde 0,1-prozentiges Trypsin dazugegeben und 1 Std. bei Zimmertemperatur inkubiert. Danach wurde Trypsin durch Zentrifugation entfernt und die Plasmamembran nach der Methode (3.1.1) isoliert.

Tabelle 4: Spezifische Aktivität (µmol/min/mg) der alkalischen Phosphatase bei der Trypsinbehandlung der aufgeschlossenen Zellen bei pH 9,5. Der Leerwert ohne Enzyme wurde abgezogen.

Probe	spezifische Aktivität
Kontrolle	8,9
aufgeschlossene Zellen plus Trypsin	4,8

Aus der Tabelle kann gefolgert werden, daß bei aufgeschlossenen Zellen die alkalische Phosphatase gegenüber der Kontrollprobe nur etwa um die Hälfte abgebaut wird. Man hätte erwartet, daß Trypsin bei aufgeschlossenen Zellen durch die bessere Zugänglichkeit einen stärkeren Effekt bewirkt. Es besteht die Möglichkeit, daß im Zellhomogenat ein Trypsininhibitor wirksam wurde. Im pflanzlichen und tierischen Gewebe wurden Trypsininhibitoren nachgewiesen (13).

3.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Nachdem die Trypsinwirkung auf die alkalische Phosphatase untersucht worden war, stellte sich die Frage, wie dieselbe Behandlung auf andere Proteine der Plasmamembran wirkt. Ein guter Überblick über das vorhandene Proteinmuster läßt sich durch die Gelelektrophorese gewinnen.
Außerdem wurde nach der Trypsinbehandlung Trypsininhibitor dazugegeben, um zu beobachten, ob während der Erholungsphase der Zellen wieder Protein synthetisiert wird.

3.3.1 Die Wirkung von Trypsin auf logarithmisch wachsende Zellen

Die Plasmamembranen wurden nach der Methode (3.1.1) isoliert. Die Zellen wurden gewaschen, in Phosphatpuffer, pH 7,5, aufgenommen, o,1-prozentiges Trypsin dazugegeben und bei 23°C 1 Std. inkubiert.
Es wurde mit 0,2 Prozent Trypsininhibitor eine weitere Stunde lang inkubiert. In die Gelelektrophorese mit 6-prozentigem Polyacrylamidgel wurde 75 - 100 µg Protein eingesetzt (2.6).

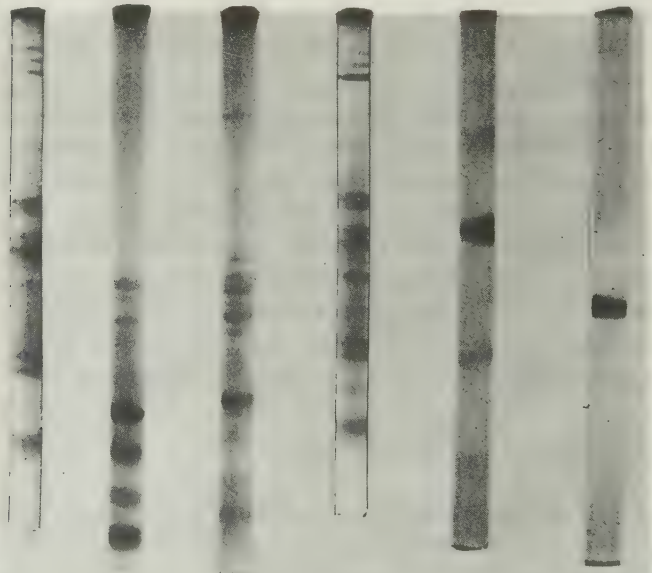


Abb.: 3

1. Proteinzusammensetzung der Plasmamembranen der logarithmisch wachsenden Zellen.
2. 1 Std. Trypsineinwirkung bei den logarithmisch wachsenden Zellen.
3. Nach der Trypsineinwirkung wurde mit Trypsininhibitor noch 1 Std. im Phosphatpuffer inkubiert.
4. Logarithmisch wachsende Zellen 2 Std. in Phosphatpuffer inkubiert.

5./6. Standardproteine, Rinder-Serumalbumin, Ovalbumin.

Durch die Trypsinbehandlung wurden die Proteinbanden, die in der Kontrollprobe vorhanden waren, zum Teil abgebaut.
Nach Zugabe von Trypsininhibitor erscheinen Proteinbanden mit M.G. über 55.000 wieder. Als Eichproteine wurden Ovalbumin M.G. 43.000 und Rinderserum M.G. 67.000 verwendet.
Die Anzahl der Banden entspricht ca. der Hälfte der Proteinbanden der Kontrollprobe im selben Abschnitt des Gels mit M.G. über 55.000. Die Abbildung zeigt die Änderungen bzw. die Banden, die nach Trypsininhibitorzugabe wiederkehren im Vergleich zu der Kontrollprobe, die 2 Std. im Puffer inkubiert wird.

3.3.2 Die Änderung der Plasmamembran während der Entwicklung

Neben der Behandlung des Membran-Proteinmusters von logarithmisch wachsenden Zellen wurde auch eine mögliche Veränderung der Membran-Proteine im Laufe der weiteren Entwicklung bis zur Aggregation untersucht.

Wenn die Zellen in Phosphatpuffer pH 6 (1 x 10^7/ml) inkubiert werden, entwickeln sie Interzellulärkontakte, die zur Aggregation führen. Dazu wurden die Zellen 0 Std., 2 Std., 9 Std. und 18 Std. inkubiert. In die Gelelektrophorese mit 6-prozentigem Polyacrylamidgel wurde 75 - 100 µg Protein eingesetzt (2.6).

Abb.: 4

1. logarithmisch wachsende Zellen (nicht in Puffer inkubiert)

2. logarithmisch wachsende Zellen, 2 Std. in Puffer inkubiert

3. logarithmisch wachsende Zellen, 9 Std. in Puffer inkubiert

4. logarithmisch wachsende Zellen, 18 Std. in Puffer inkubiert

In Abhängigkeit von der Inkubationszeit in Phosphatpuffer ändert sich das Muster der Proteinbanden. Zur Zeit O treten die obersten drei Banden nur schwach in Erscheinung. Nach der 2-stündigen Behandlung verstärkt sich die dritte Proteinbande gegenüber den beiden anderen. Zellen, die 9 Std. in Phosphatpuffer inkubiert wurden, sind aggregationskompetent. Zu diesem Zeitpunkt treten in der Gelelektrophorese der Plasmamembran die drei Proteinbanden gleich stark hervor. (Aus dem Vergleich kann man vielleicht entnehmen, daß bei der

2-stündigen Behandlung die Aggregation im Anfangsstadium ist. Bei der 18-stündigen Inkubation zeigt sich die oberste Bande besonders verstärkt.
Je weiter die Stadien fortgeschritten sind, desto mehr Protein ist in den drei oberen Banden (M.G. ca. 125.000 - 130.000) nachweisbar. Während der Entwicklung der Zellen werden also neue Membran-Proteine synthetisiert. Ein ähnliches Auftreten einer starken Proteinbande mit M.G. 130.000 wurde während der Entwicklung gefunden (27).

3.3.3 Die Wirkung von Trypsin auf die Zellen verschiedener Entwicklung

Analog zur Trypsinbehandlung von logarithmisch wachsenden Zellen (3.3.1) wurden auch sich entwickelnde Zellen nach 9 Std. und 18 Std. untersucht.

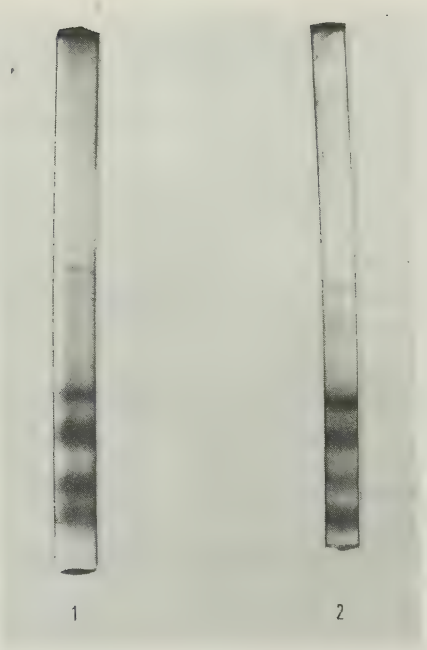


Abb. 5: 1. logarithmisch wachsende Zellen, 9 Std. in Phosphatpuffer pH 6, dann mit 0,1-prozentigem Trypsin bei pH 7,5 in Phosphatpuffer 1 Std. 23°C inkubiert.

2. logarithmisch wachsende Zellen, 18 Std. in Phosphatpuffer pH 6, dann mit 0,1-prozentigem Trypsin bei pH 7,5 in Phosphatpuffer 1 Std. bei 23°C inkubiert.

Trypsinbehandlung bei entwickelten Zellen hat den gleichen Abbau der Membran-Proteine zur Folge wie bei logarithmisch wachsenden Zellen (Abb. 3). Die desaggregierten, mit Trypsin behandelten Zellen verlieren ihre Aggregationsfähigkeit (23). Dies entspricht vermutlich dem Verlust der Membran-Proteine nach Trypsinbehandlung. Diese Proteine sind also wichtig für die Ausbildung der Zellkontakte.

3.3.4 Die Wirkung von Trypsin auf die isolierte Plasmamembran

Nach der Beobachtung, daß sich bei Trypsinbehandlung von intakten Zellen das Membranproteinmuster stark verändert, soll die Wirkung von Trypsin auf isolierte Plasmamembran gezeigt werden. Erleichterte Zugänglichkeit von Protein isolierter Membranen könnte vermehrten Trypsinabbau bewirken.
Dazu wurden die Plasmamembranen der Zellen isoliert und danach mit 0,1-prozentigem Trypsin inkubiert.
In die Gelelektrophorese mit 6-prozentigem Polyacrylamidgel wurde 75 - 100 µg Protein eingesetzt.

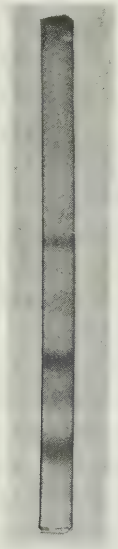


Abb.: 6 Isolierte Plasmamembranen mit Trypsin inkubiert

Es ergibt sich, daß Trypsineinwirkung bei isolierten Plasmamembranen keine anderen Veränderungen hervorruft, als bei intakten Zellen. Dies kann als ein Hinweis dafür gelten, daß sich die durch Trypsin abbaubaren Proteine auf der Zelloberfläche befinden.

3.5. Die Proteaseaktivität

Die Amöben Zellen Dictyostelium discoideum enthalten viele ungewöhnliche Enzyme. Der axenische Stamm AX-2, der auf Ashworth Medium wächst, hat Hydrolasen, die E.coli-Protein-Komplex hydrolysieren können und dabei Diaminopimelat zu Lysin umwandeln. Die Hydrolasen zeigen im sauren Bereich maximale Aktivität.

Es sollte nun untersucht werden, ob neben diesen sauren Hydrolasen auch Proteasen mit einem neutralen pH-Optimum vorkommen und ob sie bei der Aggregation eine Rolle spielen.
Bei Lymphozyten fand man eine neutrale Protease auf der Zelloberfläche und im Kulturmedium (12), dem die Autoren eine mögliche Rolle beim dynamischen Prozess der Entwicklung von Oberflächenproteinstrukturen zusprechen.
Nach dem Umschalten von dem vegetativen zum Aggregationsstadium von Dictyostelium discoideum muß ein intensiver Umbau in der Zelle erfolgen, wobei auch abbauende Proteasen eine wichtige Funktion haben könnten.

3.5.1 Die Proteaseaktivität der Zellfraktionen nach der Methode von D.F.H. Wallach

Um Proteasen nachzuweisen, wurden die logarithmisch wachsenden Zellen nach der Methode von D.F.H. Wallach aufgeschlossen und die Membranen isoliert. Zuerst sollte die Lokalisation der neutralen Protease in den Membranfraktionen und die Quantität der neutralen Protease festgestellt werden. Es werden die Mittelwerte der Messungen angegeben. Die Schwankungen der Werte betragen $\pm$ 1 - 2 %. Die Aktivitäten beziehen sich auf den verwendeten Proteingehalt des Testansatzes (3 mg/ml).

Tabelle 6 Proteaseaktivität der Zellfraktionen. Das eingesetzte C^{14} Lysin markierte E.coli Protein wurde 100 % gesetzt, Proteingehalt 1,5 mg/Ansatz, Inkubationszeit 2 Std., bei 37°C. Die im Überstand der mit TCA gefällten Probe verbliebene Radioaktivität ist aufgeführt, korrigiert um die im Überstand befindliche Aktivität ohne Zusatz von Amöbenextrakt.

pH-Wert	Rohextrakt	Lysosomen	2. Überstand ohne beschallen ohne Triton (Mikrosomen)	2. Überstand mit beschallen mit Triton (Mikrosomen)
3	63 %	4 %	33 %	8 %
5	16 %	4 %	7 %	8 %
7	5 %	6 %	6 %	12 %
9	n.b.	6 %	5 %	12 %

Die Zellen wurden aufgeschlossen und die verschiedenen Fraktionen auf Lokalisation und Quantität der neutralen Protease untersucht. Im Rohextrakt befindet sich eine hohe Aktivität an saurer Protease; es werden 63 % des angebotenen Proteinsubstrats abgebaut.
Die Isolierung von Mikrosomen wurde unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt, um die neutrale Protease zu gewinnen. Wenn der Lysosomenüberstand mit Ultraschall behandelt und danach die Mikrosomen isoliert werden, erhält man neutrale Protease, die nur mit wenig saurer Protease verunreinigt ist. Ohne Ultraschallbehandlung ist eine große Verunreinigung an saurer Protease vorhanden (Tab. 6). Mit intakten Lysosomen lassen sich nur geringe Proteaseaktivitäten messen. Nach Behandlung derselben Lysosomen mit Ultralschall (Tab. 7) ist die saure Proteaseaktivität (pH 3) stark erhöht; die neutrale Protease (pH 7) ist ebenfalls erhöht.

3.5.2 Die Proteaseaktivität der Zellfraktionen nach der kombinierten Methode

Es wurde noch eine andere Methode in Anwendung gebracht. (2.4.1), um festzustellen, ob man eine bessere neutrale Proteaseausbeute erhalten kann. Die Meßwerte sind Mittelwerte mit einer Schwankung von ca. ± 1 - 2 Prozent.

Tabelle 7: Proteaseaktivität der Zellfraktionen

Das eingesetzte ^{14}C Lysin markierte E. coli Protein wurde 100 % gesetzt; Membranprotein 1,5 mg/Ansatz, Inkubation 2 Std. bei 37°C. Die im Überstand der mit TCA gefällten Probe verbliebene Radioaktivität ist aufgeführt, korrigiert um die im Überstand befindliche Aktivität ohne Zusatz von Amöbenextrakt.

pH-Wert	Plasmamembran + Triton	Lysosomen zweimal gewaschen + Ultraschallbehandlung + Triton	2. Überstand + Ultraschallbehandlung + Triton
3	56 %	67 %	13 %
5	11 %	n.b.	8 %
7	15 %	14 %	17 %
9	n.b.	n.b.	17 %

Bei der kombinierten Methode erhält man etwas mehr Ausbeute von neutraler und alkalischer Proteaseaktivität, obwohl die Mikrosomen auf dieselbe Art (siehe Tabelle 6) behandelt wurden; (d.h. der 2. Überstand wurde mit Ultraschall behandelt und 2 % Triton X - 100 im Ansatz zugesetzt). Die Plasmamembranen zeigen bei pH 7 eine relativ hohe Aktivität der neutralen Protease.

Die Mikrosomen der aggregierten Zellen, die 18 Std. in Phosphatpuffer, pH 6, bei 23°C inkubiert wurden, wurden nach der kombinierten Methode (2.4.1) isoliert. Der 2. Überstand wurde mit Ultraschall behandelt wie bei den logarithmisch wachsenden Zellen.
Die Mikrosomen wiesen einen 22-prozentigen Abbau der eingesetzten Proteinmenge bei pH 7 auf im Vergleich zu 17 Prozent in logarithmisch wachsenden Zellen. Es ist erwiesen, daß während der Differenzierung der Proteingehalt der Zelle abnimmt. Deshalb steigt wahrscheinlich die Proteaseaktivität bei den aggregierten Zellen an.

3.5.3 Die Zeitabhängigkeit der Proteaseaktivität

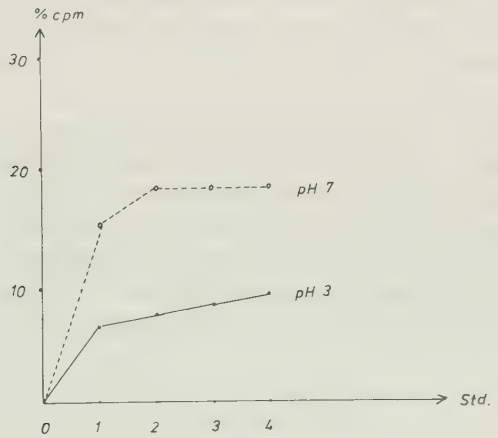


Abb. 8: Der Zeitverlauf der Hydrolyse des E. coli Proteins wird durch die mikrosomale Membran dargestellt.
Das eingesetzte ^{14}C Lysin markierte E. coli Protein wurde 100 % gesetzt. Proteingehalt 1,5 mg/Ansatz. Inkubation bei 23°C. Die im Überstand der mit TCA gefällten Probe verbliebene Radioaktivität ist aufgeführt, korrigiert um die im Überstand befindliche Aktivität ohne Zusatz von Amöbenextrakt.

Der Zeitverlauf der Proteaseaktivität zeigt, daß nach einem steilen Anstieg in der 1. Std. die Reaktion nach der 2. Std. beendet ist.

3.5.4 Die Proteaseausscheidung der Zellen ins Medium

Nachdem man Proteaseaktivität in verschiedenen Zellbestandteilen feststellte, wurde untersucht, ob die Zellen auch Proteasen ins Medium ausscheiden.

Drei 500-ml-Kolben, von denen jeder jeweils 150 ml steriles Medium enthielt, wurden mit Sporen von Amöben angeimpft und bei 23°C, 24 bzw. 48 und 72 Std. inkubiert. Jeden Tag wurde ein Kolben bei 500 g zentrifugiert und der Überstand wurde zur Bestimmung der Proteaseaktivität verwendet. Die Proben, die am 4. und 5. Tag geprüft wurden, bearbeitete man in derselben Weise.

Es wurde ein weiterer Versuch unternommen, um zu prüfen, ob die Zellen während der Aggregation auch Protease ausscheiden. Darum wurden die Zellen 18 Std. in Phosphatpuffer, pH 6, bei 23°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und der Überstand getestet. (Proteasetest 1.8.3). Die Kontrollprobe enthielt nur Phosphatpuffer.

Tabelle 8: Proteaseausscheidung der Zellen im Medium

Das eingesetzte ^{14}C Lysin markierte E. coli Protein wurde 100 % gesetzt. Das Wachstum wird verdeutlicht durch die Angabe der Zellzahl/ml. Die Inkubation betrug 2 Std. bei 37°C, pH 7. Die im Überstand der mit TCA gefällten Probe im Medium bzw. im Phosphatpuffer ohne Zellen verbliebene Radioaktivität ist aufgeführt, korrigiert um die im Überstand befindliche Aktivität ohne Zusatz von Testproben.

Zellzahl ml	Tage	Proteaseaktivität
$7,6 \times 10^5$/ml Medium	1	6 %
$5,5 \times 10^6$/ml Medium	5	3 %
$1,0 \times 10^7$/ml (in Phosphatpuffer pH 6)	18 Std. Inkubation	8 %

Die Tabelle stellt die exogene Enzymaktivität dar. Neutrale Protease wird während der Keimung ins Medium ausgeschieden. Die Proteaseaktivität des Überstandes ist am ersten Tag nach dem Animpfen mit Sporen höher als während des vegetativen Wachstums. Die aggregierten Zellen (18 Std. in Puffer) scheiden auch neutrale Protease aus. Der Überstand zeigt etwas mehr neutrale Proteaseaktivität als beim Wachstum. Während der Aggregation werden einige Zellkomponenten in der Zelle abgebaut (19), wobei Protease benötigt wird. Wahrscheinlich ist während der Keimung der Sporen mehr Protease notwendig, wie dies auch bei anderen Mikroorganismen der Fall ist, z.B. bei der Hydrolyse der Sporenwand während der Keimung von Microsporum Gypseum (20).

3.5.5 Proteaseaktivitätsnachweis bei intakten Zellen (Zelloberflächenaktivität)

Es wurde weiterhin untersucht, ob die Zelloberfläche auch eine Proteaseaktivität aufweist. Dazu wurden die logarithmisch wachsenden und auch die aggregierten intakten Zellen zu verschiedenen Zeiten inkubiert. Die Zellen wurden zuerst zweimal mit Phosphatpuffer und einmal mit Hepespuffer, pH 6 gewaschen. Nach dieser Behandlung wurden die Zellen in Hepespuffer, pH 7,5 aufgenommen, um die Proteaseaktivität an der Zelloberfläche zu bestimmen. Nach der Inkubation wurden die Zellen zentrifugiert, der Überstand wurde mit TCA gefällt und gemessen. Die Radioaktivität des Sediments wurde nach 30 Min. Inkubation mit 5 ml Aquasol gemessen.

Tabelle 9: Proteaseaktivität bei intakten Zellen

Das eingesetzte ^{14}C Lysin markierte E. coli Protein wurde 100 % gesetzt. Die Inkubation betrug 2 Std. bei 37°C, pH 7. Die im Überstand der mit TCA gefällten Probe verbliebene Radioaktivität ist aufgeführt, korrigiert um die im Überstand befindliche Aktivität ohne Zusatz von Amöben.

Zellzahl/Ansatz	Aktivität der Log:wachs:Zellen		
	3 Min.	10 Min.	30 Min.
10×10^7	9 %	11 %	18 %
	Aktivität der aggregierten Zellen		
15×10^7	3 %	4 %	8 %

Die neutrale Proteaseaktivität bei den intakten logarithmisch wachsenden Zellen und auch bei den aggregierten Zellen wurde gemessen. Die Zellen wurden 3, 10 und 30 Min. inkubiert. Die Ergebnisse zeigen, daß der Überstand der Zellen nach 3 Min. Inkubation eine Proteaseaktivität aufweist, die 9 Prozent des Proteinsubstrats abbaut; die Aktivität des Überstandes nach 30 Min. Inkubation beträgt das Doppelte.
Das gleiche Verhalten weisen die aggregierten Zellen auf. Bei diesen ist die gesamte Aktivität allerdings etwas niedriger als bei den logarithmisch wachsenden Zellen. Die Zellen selbst zeigen nach 30 Min. Inkubation keine Radioaktivität. Dies bedeutet, daß während der Inkubation kein radioaktives Substrat in die Zelle aufgenommen wurde. Daraus läßt sich schließen, daß die Zelloberfläche eine Proteaseaktivität aufweist. Es dürfte unwahrscheinlich sein, daß das Substrat in drei Minuten in die Zelle hineindiffundiert, dort hydrolysiert wird und dann wieder in Form von markierten Bruchstücken aus der Zelle herausdiffundiert.

Bevor die obengenannten Werte (Tab. 9) der Zelloberflächenaktivität als bestätigt angesehen werden können, mußte die Aktivität der isolierten Plasmamembran festgestellt werden: sie beträgt in 10 Min. bei den logarithmisch wachsenden Zellen 5 % Abbau des Proteinsubstrats bei pH 7 und bei den aggregierten Zellen ebenfalls. Diese Proteaseaktivität erreichte ca. die Hälfte von der Zelloberflächenaktivität in 10 Min. bei den logarithmisch wachsenden Zellen.

3.6 Nachweis einer aggregationsstimulierenden Substanz

Nachdem beobachtet wurde, daß neutrale Protease in Phosphatpuffer ausgeschieden wird, sollte geprüft werden, ob die Zellen außer Protease und Phosphodiesterasen noch eine andere biologisch aktive Substanz ausscheiden, die die Aggregation stimuliert.

3.6.1 Isolierung der unbekannten Substanz

Zu dieser Untersuchung wurden die Amöben in einem Phosphatpuffer, 17 mM, pH 6, ca. 18 Std. inkubiert. Nachdem die Zellen zentrifugiert wurden, wurde der Überstand mit Aquacid 1:50 konzentriert. Bei Zugabe des Konzentrats zu den logarithmisch wachsenden Zellen in Phosphatpuffer (1×10^7/ml) aggregieren die Zellen zu einem geordneten Zellaggregat mit glattem Rand bzw. mit einer scharfen Grenzlinie zur Umgebung. In den Kontrollproben aggregieren die Zellen zwar ebenfalls, jedoch nur zu einer Zellansammlung mit diffusem Rand. Ein unbekannter Stoff, der die Ausbildung der Struktur hervorruft, soll charakterisiert und weiter untersucht werden.

3.6.2 Charakterisierung der Substanz

a) biologische Aktivitätsbestimmung

Nach der Zentrifugation wurden die Zellen (5×10^6/300 ml) zweimal gewaschen. Danach gab man den Zellen 1 ml der Substanz. 0,5 ml dieser Suspension wurden auf 2 prozentige Agarplatten ausplattiert und bei 23°C inkubiert.
Man konnte nun beobachten, daß die Substanz im Vergleich zu den Kontrollproben den gesamten Lebenszyklus der Zellen um zwei Stunden beschleunigte.

b) Abhängigkeit der Aktivität von der Substanzmenge

Zu verschiedenen Mengen des Dialysats wurden frische logarithmisch wachsende Zellen dazugegeben. Die Suspensionen wurden wie oben auf 2 prozentige Agarplatten ausplattiert und bei 23°C inkubiert.

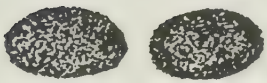


Abb.: 9 Abhängigkeit der Aktivität von der Substanzmenge

1.) 0,4 ml Substanz + 5 x 10^7 Zellen
2.) 0,2 ml Substanz + 5 x 10^7 Zellen
3.) 0,1 ml Substanz + 5 x 10^7 Zellen
4.) 0,1 ml Substanz + 5 x 10^7 Zellen
0,4 ml Puffer
5.) O-Wert: 0,5 ml Phosphatpuffer + 5 x 10^7 Zellen
1-5.) Stadien der Zellen, die bei dem Lebenszyklus zu beobachten sind (nach Shema Abb. 1).

Mehr als 0,2 ml Dialysat hindern die Aggregation. Die höchste stimulierende Aktivität der Substanz wurde gemessen, wenn 0,1 ml, 0,2 ml Substanz ohne Verdünnung und 0,5 ml einer 1:5 Verdünnung eingesetzt wurden. Bei stärkerer Verdünnung als 1:5 war die Aktivität schwer zu verfolgen (2.9.1).

c) Hitzeeinwirkung

Es besteht die Frage, ob die Substanz beim Erhitzen denaturiert wird. Um diese Frage zu untersuchen, wurde 0,1 ml der Substanz in 0,4 ml Puffer pipettiert und 10 Min. in einem Wasserbad von 80°C inkubiert. Nach der Abkühlung wurden die Zellen (5×10^7) dazugegeben. Diese Suspension wurde auf 2-prozentige Agarplatten ausplattiert und bei 23° C inkubiert.
Zum Vergleich wurde ein Versuch mit derselben Substanz ohne Erhitzen durchgeführt. Aus den Versuchen konnte man entnehmen, daß die isolierte Substanz hitzeempfindlich ist. Im Versuch ohne Erhitzen mit der 0,1 prozentigen Substanz bildeten die Zellen schneller Sporen als im Versuch mit Erhitzen.
Die Hitzeinaktivierbarkeit deutet auf ein Protein. Um diese Vermutung zu erhärten wurde die Substanz mit Trypsin inkubiert.

d) Trypsinwirkung auf die Substanz

Folgendes wurde beobachtet (siehe Abb. 10):

Abb. 10 Einfluß der Substanz mit Trypsin auf die Zellen

1.) 0,1 ml Substanz, 0,1 ml Trypsin + 0,3 ml Phosphatpuffer, pH 7,5, + 5 x 10^7 Zellen

2.) 0,1 ml Substanz, ohne Trypsin, + 0,4 ml Phosphatpuffer, pH 7,5 + 5 x 10^7 Zellen

3.) 0,5 ml Phosphatpuffer, pH 7,5 + 5 x 10^7 Zellen

1.- 3.) Stadien der Zellen, die bei dem Lebenszyklus zu beobachten sind (nach Schema Abb. 1).

Die Probe mit Trypsin aggregiert später als diejenigen Proben, in denen nur Substrat (ohne Trypsin) enthalten ist. Die Kontrollproben enthalten nur Zellen und Puffer; weder Substanz noch Trypsin. Der Versuch weist auf, daß diese Substanz trypsinempfindlich ist, also wahrscheinlich ein Protein ist.

e) Prüfung der Aggregation der Zellen aus verschiedenen Stadien

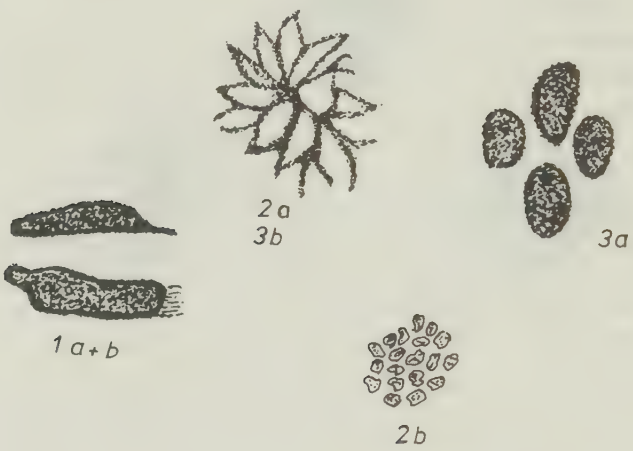


Abb. 11: Einwirkung der Substanz auf die Zellen aus verschiedenen Stadien

1.) a) aggregationskompetente Zellen + 0,1 ml Substanz
b) Kontrollprobe ohne Substanz
2.) a) stationäre Zellen + 0,1 ml Substanz
b) Kontrollprobe ohne Substanz
3.) a) logarithmisch wachsende Zellen + 0,1 ml Substanz
b) Kontrollprobe ohne Substanz
1-3.) Stadien der Zellen, die bei dem Lebenszyklus zu beobachten sind (nach Schema Abb. 1).

Die Zellen der stationären Phase aggregieren langsam, auch wenn die Substanz vorhanden ist. Die Kontrollprobe der stationären Zellen ohne Substanz aggregieren sehr langsam, erst am nächsten Tag.

Die 8-stündigen aggregationskompetenten Zellen auf der Agarplatte aggregieren sehr schnell, auch wenn in der Probe keine Substanz vorhanden ist. Die substanzbehandelte Probe und unbehandelte Probe aggregiertengleichzeitig. Mit der Substanz aggregieren die logarithmisch wachsenden Zellen schneller als die Kontrollprobe ohne Substanz.

3.6.3 Reinigung der unbekannten Substanz über Bio-Gel A-0,5

Die Dialysate (2 ml) wurden auf eine Bio-Gel-Säule (A-0,5) aufgetragen und mit Na-Phosphatpuffer, pH 6, im Kühlraum eluiert.
Der Protein Peak erschien bei den Fraktionen 34, 35, 36, 37, 38 und 39.

Abb. 12: Diagramm der Säule

3.6.4 A. Biologische Aktivität der Fraktionen (der Substanz)

Die Fraktionen der Säule wurden biologisch durchgetestet und gleichzeitig die Phosphodiesterase bestimmt.

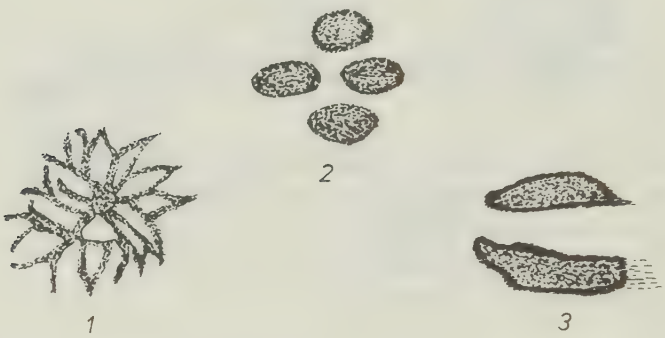


Abb. 13: Einfluß der Fraktionen (der Substanz) auf die Zellaggregation

1.) Die Kontrollprobe und die Fraktionen 40-44 und 50 zeigen mikroskopisch etwas langsamere Aggregation als 2) und 3)

2.) Die Aggregation der Zellen wurde durch die Fraktionen 34 - 39 beschleunigt.

3.) Die Aggregation der Zellen wurde durch die Fraktionen 45 - 49 noch weiter entwickelt als durch die Fraktionen 34 - 39.

1-3.) Stadien der Zellen, die bei dem Lebenszyklus zu beobachten sind (nach Schema Abb. 1).

Die Aggregation der Amöben-Zellen wurde durch die Fraktionen 34 - 39 im Vergleich zu der Kontrollprobe und durch die Fraktionen 39 - 44 beschleunigt. Aber die Fraktionen 45 - 49 beschleunigen die Aggregation der Zellen noch um eine Stufe weiter (von Stufe 2 → 3, Abb.13). Es besteht die Frage, ob die Fraktionen Phosphodiesterase enthalten.

Deswegen wurde die Phosphodiesterasebestimmung der Fraktionen mit dem Zeiss-Photometer bei 265 nm durchgeführt.

B. Phosphodiesterasebestimmung bei denselben Fraktionen

Die Extinktionsänderungen wurden in Abständen von 10 Min. gemessen. Die Proben werden jeweils mit einer Kontrollprobe, welche kein cyklisches AMP enthält, gemessen. Die Ausgangswerte beziehen sich auf O-Minuten.

Fraktionen-Nr.	Extinktion bei 265 nm nach 10 Min.
34	keine Extinktionsänderung
35	"
36	"
37	"
38	"
39	"
40	"
41	"
42	"
44	"
45	0,24 Abnahme
46	0,32 Abnahme
48	0,26 Abnahme
49	0,25 Abnahme
50	keine Extinktionsänderung

Die Extinktionsänderungen bei den Fraktionen 45, 46, 48 und 49 betrugen 0,24, 0,32, 0,26 und 0,25. Dagegen trat bei den Peaks 34, 35, 36, 37, 38 und 39 keine Änderung der Extinktion auf. Die cAMP wird durch Phosphodiesterase hydrolysiert. Bei den Fraktionen 45, 46, 48 und 49 erfolgte eine Spaltung, die auf Phosphodiesteraseaktivität deutet; durch diese Enzymaktivität sind 0,27,0,37,0,32,0,30 µmol Inosine in 1 Min. gebildet worden (siehe 2.9.3).
In den Fraktionen 34 - 39 befinden sich Proteine, jedoch ist keine Phosphodiesterase nachweisbar.

4. DISKUSSION

Ausgehend von der Annahme, daß spezifische Proteine oder Enzyme auf der Zelloberfläche eine wesentliche Rolle bei der Aggregation von Dictyostelium discoideum spielen, wurde die Wirkung von Trypsin auf die Amöben Zellen untersucht.
Man kann mikroskopisch beobachten, wie die Trypsinbehandlung auf die intakten Zellen wirkt. Wenn die Zellen frisch aus den Sporen angezogen und mit Trypsin inkubiert werden, sind sie weniger kompakt agglutiniert als die unbehandelten Zellen. Bei alten Zellen, die vor 1-2 Monaten aus den Sporen angezogen worden waren, beobachtet man diesen Unterschied nicht so deutlich. Bevor man die Zelloberflächenaktivität der trypsinbehandelten Zellen untersucht, sollte man prüfen, ob die trypsinbehandelten Zellen sich außer in der Aggregationsfähigkeit noch in anderen Eigenschaften ändern (z.B. in der Vermehrung). Die Wachstumskurve der Zellen, die 1 Std. mit Trypsin inkubiert und anschließend mit Trypsininhibitor behandelt wurden, zeigt keine Verzögerungsphase. Jedoch ergibt sich ein verzögertes Wachstum bei Zellen, die 9 Std. mit Trypsin und dann mit Trypsininhibitor inkubiert worden waren. Da sich aber auch bei den Kontrollzellen,die 9 Std. nur in Puffer inkubiert wurden, dieselbe Wachstumsverzögerung zeigt, ist dies auf ein Aushungern der Zellen zurückzuführen. Nach 9 Std. Inkubation im Phosphat-Puffer sind die Zellen als aggregationsbereit anzusehen. Dieses Anfangsstadium der Differenzierung muß rückgängig gemacht werden, ehe die Zellen sich wieder mit normaler Geschwindigkeit in der Vegetationsphase vermehren können.

Loomis hat bewiesen, daß alkalische Phosphatase des Zellumens (bei Stamm Nc-4) die maximale Aktivität während der Aggregation (18-31 Std.) aufweist (16).

Bei diesem Vorgang muß c-AMP ausgeschieden und von der Phosphodiesterase zu 5'-AMP hydrolysiert werden; dieses 5'-AMP wird durch alkalische Phosphatase weiter gespalten, wobei Adenosin gebildet wird (17).
Die allgemeine Fragestellung in der Membranbiologie über die Verteilung von Enzymaktivität auf die innere oder äußere Oberfläche sollte an der alkalischen Phosphatase untersucht werden.

Um zu prüfen, ob sich die alkalische Phosphatase auf der Zelloberfläche befindet, wurde die Änderung ihrer Aktivität nach der Einwirkung von Trypsin auf intakte Zellen, d.h. auf die zugängliche Zelloberfläche untersucht. Nach 1 Std. Inkubation auf intakte Zellen zeigt sich jedoch nur eine geringe Abnahme der Aktivität der alkalischen Phosphatase. Im Vergleich zu den logarithmisch wachsenden Zellen wurden auch die aggregierten Zellen nach 18 Std. Inkubation in Phosphatpuffer pH 7,5 untersucht. Die aggregierten Zellen besitzen erwartungsgemäß mehr alkalische Phosphatase an der Zelloberfläche .
Da bei Aufschluß der Zellen mit flüßigem Stickstoff die Aktivität der alkalischen Phosphatase stark vergrößert ist, scheint ein beträchtlicher Teil im Membraninneren lokalisiert zu sein. Diese Aktivität ist nach Trypsinbehandlung ganzer Zellen stark verringert (Tab. 2). Das Trypsin konnte dabei Proteine, die die alkalische Phosphatase umgeben, abbauen und danach die alkalische Phosphatase, die von außen nicht meßbar ist, selbst angreifen. Die Aktivität der alkalischen Phosphatase bei aufgeschlossenen und anschließend mit Trypsin behandelten Zellen wird weniger abgebaut als bei Trypsineinwirkung vor dem Aufschluß. Man fragt sich, ob in aufgeschlossenen Zellen ein Trypsininhibitor wirksam ist, wie er in pflanzlichen und tierischen Geweben nachgewiesen ist.

Die Bestimmung der Verteilung der alkalischen Phosphatase auf die Zellfraktionen von logarithmisch wachsenden Zellen ergab, daß sich die alkalische Phosphatase größtenteils in der Plasmamembran befindet. Dies stimmt mit den Ergebnissen von Green und Newell (11) überein.

Es ist interessant zu beobachten, daß bei Dictyostelium discoideum während der Aggregation sowohl im Zellumen (16) als auch an der Zelloberfläche die alkalische Phosphatase zunimmt (Tab. 1). Durch diese Ergebnisse ist erhärtet, daß die alkalische Phosphatase bei der Differenzierung von Dictyostelium discoideum eine wichtige Rolle spielt.

Wenn die Zellen im PO_4-Puffer (1×10^7/ml) inkubiert werden, entwickeln sie interzelluläre Kontakte, die zur Aggregation führen. Während dieser Behandlung erscheint Lectin an der Oberfläche, das für die Aggregation verantwortlich ist. Dieses Lectin nimmt während der Differenzierung zu. Demzufolge sollte Trypsinbehandlung von intakten Zellen bzw. der Zelloberfläche wesentliche Änderungen im Membranmuster bewirken.
Wenn die Zellen 1 Std. mit Trypsin inkubiert werden, zeigt sich ein starkes Zurückgehen der Proteinbanden in der Elektrophorese. Diese Banden erscheinen zum Teil wieder, wenn die Zellen anschließend mit Trypsininhibitor inkubiert werden.
Wenn die Zellen im Phosphatpuffer inkubiert werden, erlangen sie nach 9 Std. Aggregationskompetenz. In diesem Zustand zeigen die Zellen die in Abb. (4,5) entstehenden Banden. Mit zunehmender Entwicklungsdauer (2 Std, 9 Std. und 18 Std.) erscheinen die Proteinbanden M.G. Bereich 130.000 immer stärker; dies korreliert mit der Zunahme an Aggregationsfähigkeit. Während der Entwicklung werden also neue Membranproteine synthetisiert. Da Trypsin bei intakten Zellen einen starken Abbau der Membranproteine bewirken kann, scheinen diese Proteine an der Zelloberfläche zu sitzen und für

die Ausbildung der Zellkontakte wichtig zu sein. Dies würde der Beobachtung von Sussmann entsprechen, der zeigte, daß mechanisch disaggregierte Zellen, die auch EDTA resistent sind, nach Trypsinbehandlung die Fähigkeit der Aggregation verlieren (29).
Es ist denkbar, daß mit den Proteinen, die abgebaut werden, auch die Receptoren, die für den Zellkontakt verantwortlich sind, zerstört werden. Dies könnte die Ursache für den fehlenden Zellkontakt der mit Trypsin behandelten Zellen sein.

Da die alkalische Phosphataseaktivität durch Trypsin verringert wird (s.o.) könnte die alkalische Phosphatase eine der durch Trypsinbehandlung verschwundenen Protein-Banden in der Gelelektrophorese darstellen.

Es wurde gezeigt, daß die m-RNS-Synthese für das kohlenhydratbindende Protein (Lectin) bei Dictyostelium discoideum, die auf Bakterien wachsen, innerhalb von ein bis zwei Stunden beginnt. Wenn die Zellen im Phosphatpuffer inkubiert werden, kann das entsprechende Protein nach 3 bis 4 Std. nachgewiesen werden (8).

Axenische Zellen haben dagegen einen höheren Spiegel von Agglutinationsfaktoren und aggregieren dadurch schneller. Die Änderungen der Zelloberfläche der Amöben während der Differenzierung kann durch Concanavalin A (ConA) festgestellt werden. Beim Stamm AX-2 haben 0,9 x 10^6 Zellen/ml die Fähigkeit, in 10 Min. zu agglutinieren; mit ConA agglutinieren 1,6 x 10^6 Zellen/ml in 10 Min. Der NC-4 Stamm braucht 8 mg/ml ConA, um 79% Zellen zu agglutinieren. Im Gegensatz dazu benötigt der Stamm AX-2 0,8 mg/ml ConA, um 75 % der Zellen zu agglutinieren (30).

Aufgrund dieser Ergebnisse kann man annehmen, daß beim Stamm AX-2 die Synthese des erwähnten Proteins bereits vor Ablauf von 3 Std. durchgeführt ist. Loomis meint, daß die Zellen in der axenischen Kultur halb ausgehungert sind, daß deshalb die frühe Entwicklung stattfindet (8).

Ähnliches läßt das Auftauchen eines verstärkten Proteinbandes auf der Gelelektrophorese schon nach 2 Std. (Inkubation in Phosphatpuffer) vermuten. Dies kann als ein erster Schritt zur Erreichung der späteren vollen Aggregationskompetenz angesehen werden.
Die Amöbe Dictyostelium discoideum enthält verschiedene ungewöhnliche Enzyme z.B. Mureinhydrolasen und N-Acetylglucosaminidase. Außerdem enthalten die Amöben Peptidase, welche Murein Peptide hydrolisieren (7). Diese Hydrolyse zeigt bei pH 3 die optimale Aktivität, was typisch ist für die lysosomalen Enzyme der Amöbe (2). Außer dieser sauren Protease wurde nun eine neutrale Protease auf der Oberfläche und im Medium nachgewiesen. Dies entspricht neuen Ergebnissen bei Lymphozyten (12); und in diesem System fand man oberflächenständige Proteasen. Es sollte geprüft werden, welche besonderen Funktionen die neutrale Protease von Dictyostelium discoideum bei der Aggregation hat.

Es konnte gezeigt werden, daß die neutrale Protease sowohl mikrosomal als auch an die Cytoplasmamembran gebunden ist. Die Ergebnisse über die Untersuchung zur Aktivität von saurer und neutraler Protease sind in der Tabelle 6-7 zusammengestellt. Hieraus wird ersichtlich, daß die höchste Enzymaktivität der neutralen Protease in einem pH-Bereich von 7-9 liegt. Sie beträgt in Mikrosomen etwas mehr als in der Plasmamembran und in Lysosomen.
Bei aggregierten Zellen (18 Std. in Phosphatpuffer) ist die neutrale Proteaseaktivität (mikrosomal) etwas erhöht. Prüft man die Zeitabhängigkeit, so findet man bei $23^{o}C$ im pH-Bereich 3 und 7 in der ersten Stunde einen steilen Anstieg der Enzymaktivität. Die Reaktion ist nach 2 Std. beendet.

Die Tabelle 8 zeigt, daß die Protease ins Medium ausgeschieden wird und ihre Aktivität am ersten Tag höher ist als am fünften Tage.

Die Proteaseausscheidung ins Medium ist also während der Keimung (1.Tag) höher als beim Wachstum (5. Tag).
Bei Blastocladiella emersonii (28) wird Protease ebenfalls während der Keimung der späten Phase (Sporulation) ins Medium ausgeschieden. Die Untersuchungen verschiedener Autoren belegen, daß proteolytische Enzyme bei verschiedenen Mikroorganismen einige wichtige Funktionen ausüben.
Z.B. werden für die Hydrolyse der Sporenwand aktive proteolytische Enzyme benötigt, z.B. während der Keimung von Microsporum Gypseum (20). Während der Sporulation des Bacillus cereus wird Fructose 1,6-Diphosphataldolase proteolytisch gespalten (26). Die Aktivität der Serinprotease ist bei Bacillus subtilis während der Sporulation beträchtlich erhöht und wird anschließend im Medium gefunden (24).

Aggregierte Zellen von Dictyostelium discoideum (18 Std. Inkubation in Puffer) scheiden ebenfalls eine neutrale Protease aus (2.8.5). Sonneborn vermutet als mögliche Funktion von Proteaseausscheidung, daß im Entwicklungszyklus der Zellen beim Übergang von einem zum anderen Stadium einige Proteine hemmend eingreifen können, so daß kein neues Stadium gebildet wird. Diese Proteine müßten in der Zelle von einer Protease abgebaut werden (28). Nachdem diese Wirkung der Protease stattgefunden hat, wird sie zum Teil aus der Zelle ausgeschieden. Neurospora Zellen z.B. enthalten Proteinasevesikeln, die sie extrazellulär ausscheiden (18).
Newell meint, daß bei Dictyostelium discoideum während der Aggregation einige Zellkomponenten abgebaut werden (19); entsprechend nimmt während der Differenzierung der Proteingehalt der Zelle ab (2).
Bei aggregierten Zellen (18 Std. in Puffer) ist die mikrosomale neutrale Proteaseaktivität etwas erhöht (3.5.2).
Dieses Ergebnis wird durch die Arbeit von Newell und Ashworth bestätigt.

Es zeigte sich weiterhin, daß auch die Zelloberfläche eine Proteaseaktivität aufweist; die Messungen ergeben, daß sich bei den Logzellen die Enzymaktivität von der 3. bis zur 30. Min. verdoppelt (Tab. 9).
Es dürfte unwahrscheinlich sein, daß das Substrat in der 3. Minute in die Zelle aufgenommen wird, dort hydrolysiert wird und dann wieder in Form von markierten Spaltstücken (Lysin) aus der Zelle hinausdiffundiert. Dieselben Zellen weisen auch nach 30 Min. Inkubation keine Radioaktivität auf. Darum kann man annehmen, daß das Substrat nicht von der Zelle aufgenommen zu werden braucht. Aggregierte Zellen (18 Std. im Puffer inkubiert) zeigen etwas geringere Aktivität der Protease auf der Oberfläche (Tab. 9) als bei den Logzellen. Dies könnte darauf hindeuten, daß diese Zelloberflächenprotease bei aggregierten Zellen weniger benötigt wird.
Schließlich sollte wie bei der alkalischen Phosphatase die Verteilung auf die Innen- bzw. Außenseite der Membran getestet werden . Die Proteaseaktivität isolierter Plasmamembran beträgt nur etwa die Hälfte (10 Min. Wert) der intakten Zelle, d.h. der Zelloberfläche. Für die alkalische Phosphatase wurde im analogen Experiment eine Aktivitätserhöhung in der isolierten Plasmamembran gefunden und daraus auf eine Lokalisation auch an der Membraninnenseite geschlossen. Da bezüglich der Proteaseaktivität - trotz der vermehrten Zugänglichkeit von Innenseiten bei isolierten Membranen - sogar eine niedrigere Aktivität auftritt, ist sie wohl größtenteils auf der Zelloberfläche lokalisiert.

Wie bereits im Ergebnisteil dargestellt wurde, können den neutralen Proteasen einige Funktionen zugeordnet werden. Die Protease spielt eine Rolle bei der Keimung und auch beim interzellulären proteolytischen Abbau während der Aggregation.

Außerdem läßt sich bei den Zellen auch an der Zelloberfläche eine Proteaseaktivität nachweisen. Diese Proteasen können mehrere Funktionen ausüben:

a) zellfremde Makromoleküle, die den Zellen schaden können, werden durch Protease hydrolysiert; die entstehenden niedermolekularen Spaltstücke sind inaktiv.

b) die Protease zerkleinert extrazelluläre Makromoleküle in kleinere Peptidbruchstücke, die von den Zellen leicht aufgenommen und verdaut werden können.

Die bei den differenzierten Zellen verminderte Proteaseaktivität (Zelloberfläche) deutet möglicherweise auf ihre hauptsächliche Funktion bei wachsenden Zellen hin.

Schließlich wurde eine unbekannte Substanz geprüft, die die Zellen - außer der Protease - ausscheidet, und die die Aggregation fördert.
Dazu wurden die Zellen ca. 18 Std. im Phosphatpuffer inkubiert und anschließend zentrifugiert. Der konzentrierte Überstand wurde zu den logarithmisch wachsenden Zellen gegeben, worauf diese aggregierten und ein membranähnliches Gebilde ergaben. Die Gebilde, die bei der Kontrollprobe entstanden, waren im Gegensatz dazu nicht so glatt und membranähnlich ausgebildet. Die Substanz erwies sich als hitzeempfindlich und durch Trypsin angreifbar.

Die Phosphodiesterase konnte über eine Biogelsäule (A-0,5) von der Substanz abgetrennt werden (Fraktion 45 - 49). Die Phosphodiesterase enthaltenden Fraktionen stimulieren die Aggregation am meisten. Die Fraktionen 34 - 39, die keine Phosphodiesterase enthielten, zeigten im Vergleich zur Kontrollprobe (die 20 Min. später aggregierten) eine biologische Aktivität. Die Versuche legen den Schluß nahe, daß in der Zelle neben Phosphodiesterase ein weiterer Stoff vorliegt, der die Aggregation fördert. Auch die Arbeit von Klein und Darmon (14) stützt diese Hypothese.

In ihren Versuchen mit Mutanten (Agip 53) und auch mit Ax-2 Zellen wurde eine Substanz, die die Aggregation stimuliert, jedoch schon nach 2-3 Std. gebildet. Diese Substanz ist auch trypsinempfindlich und verliert ihre biologische Aktivität bei 60° C.

Sie vermuten, daß in den ersten 3 Stunden der Inkubation mit Phosphatpuffer Glykoproteine ausgeschieden werden, die die Ax-2 Zellen zur Aggregation anregen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Bei der 1-stündigen Trypsinbehandlung der Zellen wird nicht das Wachstum verzögert, aber bei der 9-stündigen. Dieselbe Verzögerung findet auch bei der Kontrollprobe statt. Durch die Aushungerung der Zellen müssen sie sich vor der Vermehrung zuerst wieder metabolisieren.

In der Elektrophorese ist ein starkes Zurückgehen der Proteinbanden sichtbar, wenn die Amöben Zellen 1 Stunde mit Trypsin inkubiert wurden (Trypsin behandelte Zellen können keinen Zellkontakt mehr ausbilden, d.h., die Zellen aggregieren nicht mehr). Diese Proteinbanden erscheinen zum Teil wieder, wenn die Zellen mit Trypsininhibitor behandelt werden, gleichzeitig nimmt die Aggregationsbereitschaft wieder zu.

Während der Entwicklung der Amöben werden mehrere neue Proteine synthetisiert, die in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese sichtbar gemacht werden können. Je später die Stadien sind, desto mehr Proteine sind nachweisbar.

Der größte Teil der Phosphatase befindet sich in der Plasmamembran. Es wurde festgestellt, daß das Enzym von Trypsin bei intakten Zellen stärker angegriffen wird als bei aufgeschlossenen Zellen. Gleichzeitig ist die Zelloberflächenaktivität der Phosphatase von Trypsin weniger angreifbar.

Es konnte gezeigt werden, daß die Zelloberflächenaktivität einer alkalischen Phosphatase während der Aggregation zunimmt.

Der Einfluß von Trypsin auf die Aktivität der alkalischen Phosphatase wurde untersucht, um festzustellen, ob dies vielleicht eines der Proteine ist, die in der Membran

durch Trypsin zerstört werden.

Eine neutrale Protease konnte nachgewiesen werden; dieses Enzym liegt sowohl mikrosomal, als auch an die Plasmamembran gebunden vor. Bei aggregierten Zellen ist die Aktivität der Mikrosomen etwas erhöht.

Während der Keimung der Sporen ist die Aktivität der neutralen Protease im Medium und bei den aggregierten Zellen im Phosphatpuffer nachweisbar.

Es konnte bei den neutralen Proteasen festgestellt werden, daß ihre Zelloberflächenaktivität bei aggregierten Zellen geringer ist als bei logarithmisch wachsenden Zellen.

Es konnte eine unbekannte Substanz nachgewiesen werden, sie wird von den Zellen in Phosphatpuffer ausgeschieden. Diese Substanz ist hitzeempfindlich, wird von Trypsin gespalten und stimuliert die Aggregation.

6. Literaturverzeichnis

(1) Alexopaulos, C.J. 1966. Einführung in die Mykologie

(2) Ashworth, J.M., and E. Wiener. 1970. The Isolation characterization of lysosomal particles from Myxamoebae of the cellular slime mould Dictyostelim discoideum. Biochem. J. 118: 505-512.

(3) Ashworth, J.M., and D.J. Watts. 1970. Growth of Myxamoebae of the cellular slime mould Dictyostelium discoideum in axenic culture. Biochem. J. 119: 171-174.

(4) Biochem. Information.Boehringer Mannheim.

(5) Bonner, J.T. 1967. The cellular slime moulds.N.Y.Princeton University Press.

(6) Bonner, J.T. 1969. Acrasin, Acrasinase and the sensitivity to Acrasin in Dictyostelium discoideum. Devel. Biol. 20: 72-87.

(7) Braun, V., K. Hantke, H. Wolf, and G. Gerisch. 1972. Degradation of the Murein. Lipoprotein complex of E. coli cell walls by Dictyostelium amoebea. Eur. J. Biochem. 27: 116-125.

(8) Chi-Hung Siu, R.A. Lerner, and W.E. Loomis. 1976. Developmentally regulated proteins of the plasma membrane of Dictyostelium discoideum the Carbonhydrate-bindingprotein. J. Mol. Biol. 100: 157-178.

(9) Gerisch, G., 1968. Cell aggregation and differentiation in Dictyostelium discoideum. Curr. Top. Develop. Biol. 3: 157-197.

(10) Gerisch, G., W. Roos, and C. Scheidegger. 1977. Adenylate cyclase activity oscillations as signals for cell aggregation in Dictyostelim discoideum. Nature Vol. 266: 17 March 259-261.

(11) Green, A., and P.C. Newell. 1974. The isolation and subfractionation of Plasmamembrane for the cellular slime mould Dictyostelium discoideum. Biochem. J. 140: 313-322.

(12) Grayzel, A.I., V.B. Hatcher , and G. Lazarus. 1975. Protease activity of normal PHA stimulated human Lymphocyten. Cell. Immun. 18 (1): 210-219

(13) Karlson, P. Kurzes Lehrbuch der Biochemie, 9. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart.

(14) Klein, C., and M. Darmon. 1976. A differentiation stimulating factor induces cell sensitivity to 3':5'-cyclic AMP pulses in Dictyostelium discoideum. Proc. Nat. Acad. sci. U.S.A. Vol. 73: No. 4. 1250-1254.

(15) Lowry O.H., and N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randal. 1951. Protein measurment with the folin phenol reagent. J. Bio. Chem. 193: 265-275.

(16) Loomis, W.F. 1969. Developmental regulation of alkaline phosphatase in Dictyostelium discoideum. J. Bact. 100: 417-422.

(17) Malchow, D., B. Nägele, H. Schwarz, and G. Gerisch. 1972. Bound cyclic AMP phosphodiesterase in chemotactically responding cells of Dictyostelium discoideum. Eur. J. Biochem. 28: 136-142.

(18) Matile, P. 1965. Intralzelluläre Lokalisation proteolytischer Enzyme von Neurospora crassa. Zeitschrift für Zellforschung 65: 884-896.

(19) Newell, P.C. 1971. The development of cellular slime mould Dictyostelium discoideum, A model system for the study of cellular differentiation. Biochem. 7: 87-126.

(20) Orlowski, M., and D. White. 1974. Intracellular proteolytic activity in developing Myxospores of Myxococcus xanthus. Arch. Mikrobio. 97: 347-357

(21) Ordenthal, H. 1973. Dissertation Phospholipid-Stoffwechsel in subzellulären Membranen von Dictyostelium discoideum-Amöben.

(22) Perish, R.W., and C. Pelli. 1974. Alkaline Phosphatase of Dictyostelium discoideum: Cell surface location and colchicine effect on internalization during phogocytosis. Febsletter Vol. 48: No. 2.

(23) Rosen, S.D., T.A. Kafka, D.L. Simpson, and S.H. Barondes. 1973. Developmentally regulated, carbohydratebinding protein in Dictyostelium discoideum. Proc. Nat. Aca. Sci. Vol. 70: 2554-2557.

(24) Reysret, G., and J. Millet. 1972. Characterization of an intracellular protease in B. subtilis during sporulation. Biochem. Biophy. Res. Comm. Vol. 49:2.328-333.

(25) Müller, H. 1976. Dissertation zur Biochemie bakterieller Membranen.

(26) Sadoff, H.L., E. Celikkol, and H.L. Engelbrecht. 1970. Conversion of bacteria aldolase from vegetative to spore form by sorulation specific Protease. Proc. Nat. Acad. sci. (wash) 66: 844.

(27) Smart, J.E.,and R.O. Hynes. 1974. Developmentally regulated cell surface alteration in Dictyostelium discoideum. Nature Vol.251 September 27. 319-221.

(28) Sonneborn, D.R., and W.R. Lodi. 1974. Protein degradation and Protease activity during the life cycle of Blastocladiella emersonii. J. of Bact. Vol. 117: No.3 1035-1042.

(29) Sussmen, M., S. Alexander, and R.Brackenbury. 1975. Tryptic destruction of aggregative competence in Dictyostelium discoideum and subsequent recovery. Vol.245: April 24. 698-699.

(30) Weeks, C., and G. Weeks. 1975. Cell surface changes during the differentiation of Dictyostelium discoideum. Experimental cell Research 92: 372-382.

(31) Wallach, D.F.E.,and V.B.Kanat.1966. Methods Enzymology 8: 164.

Lebenslauf

Als jüngste Tochter des Philologen Sri. Saradakanta Sarkar und der Kunstmalerin Srimati Charubala Sarkar, geborene Roy, wurde ich am 24.10.1939 in Gopalganj geboren.

Nach der Grundschule besuchte ich ab 1952 die Highschool und anschließend das Scottish Chusch College (in Kalkutta), an dem ich 1959 die naturwissenschaftliche Reifeprüfung (I.sc.) ablegte. Im gleichen Jahr begann ich mit dem Studium der Naturwissenschaften an der Kalkutta Universität. Ende 1961 bestand ich Bachelor of Science. Danach studierte ich ein paar Semester Medizin. Anschließend wollte ich europäische Kultur kennenlernen. Nachdem ich die notwendigsten Sprachkenntnisse besaß, studierte ich von 1964 bis 1970 Mikrobiologie an der Georg-August-Universität Göttingen, wo ich 1970 die Diplomprüfung bestand.

Nach dreijährigem Aufenthalt in Indien begann ich im September 1974 mit der Promotionsarbeit an der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen, am Institut für Biologie II Lehrstuhl Mikrobiologie II.

Meine akademischen Lehrer waren:

F. Amelunxen
L. Bergmann
V. Braun
H. Brockmann
P. Das
G. Deuticke
N. Ganguli
T. Ghosh
O. Glemser
G. Gottschalk
W. Jost
W. Koch
P. Lorenzen
P. Nandy
F. Pfennig
A. Pirson
R. Purkaestka
G. Robbelen
A. Sarkar
H.G. Schlegel
W. Seubert
N. Thiele
R. Trebst
H. Zähner